

UNTERSUCHUNGEN
ÜBER VERÄNDERUNGEN IM ERYTHROZYTENSTOFFWECHSEL
NACH WÄRMEEINWIRKUNG
(Ein Beitrag zur Szintigraphie und Funktionsprüfung
der Milz)

von
HEINZ - WERNER NITSCHKE

1960

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. R. Duesberg

UNTERSUCHUNGEN
ÜBER VERÄNDERUNGEN IM ERYTHROZYTENSTOFFWECHSEL
NACH WÄRMEEINWIRKUNG
(Ein Beitrag zur Szintigraphie und Funktionsprüfung
der Milz)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

HEINZ-WERNER NITSCHKE
aus Hof/Saale

MAINZ 1968

Dekan: Professor Dr. med. Dr. Thews
Referent: Privatdozent Dr. med. J. Fischer
Korreferent: Professor Dr. med. R. Duesberg
Tag der mündlichen Prüfung: 23. November 1968



Gesamtherstellung: Ditters Bürodienst Mainz

MEINEN ELTERN
IN DANKBARKEIT
GEWIDMET

EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Die Milz ist ein Organ, das durch seine verborgene anatomische Lage unter der linken Zwerchfellkuppel der direkten Untersuchung durch Perkussion und Palpation nur schwer zugänglich ist. Eine Vergrößerung der Milz kann nach der Lehrmeinung im allgemeinen erst bei einer Verdreifachung ihres Volumens durch Palpation festgestellt werden. Bei Splenomegalien ist es üblich anzugeben, um wieviel Zentimeter oder Querfinger die Milz den linken Rippenbogen überragt, bzw. in welchem Areal (Längs- und Querdurchmesser) die Milzdämpfung perkutiert werden kann. Eine zutreffende Abschätzung der wahren Größe der Milz gelingt jedoch weder mit den klinischen Methoden noch mit den Verfahren der Radiologie.

Mit Hilfe der Milzzintigraphie war es erstmalig möglich, Größe, Form und Lage dieses Organs in zuverlässiger Weise zu erfassen (Abbildung 1 und 2). Mit dem von FISCHER und WOLF angegebenen Verfahren kann darüber hinaus eine quantitative Abschätzung der Milzgröße in vivo erreicht werden (FISCHER und WOLF 1963).

Die Milzzintigraphie ist inzwischen ein unentbehrliches diagnostisches Verfahren in der Klinik, und sie besitzt ihre gesicherten Indikationen:

1. Objektive Bestimmung der Lage und Form der Milz
2. Quantitative Bestimmung der Milzgröße
3. Differentialdiagnose von Tumoren im linken Oberbauch
4. Nachweis von Nebenmilzen nach Splenektomie
5. Nachweis von Situs inversus, Transposition oder Ektopie der Milz
6. Nachweis von Parenchymverlust der Milz: Infarkte, Cysten, Nekrosen, Abszesse, Tumoren
7. Nachweis einer Milzaplasie.

Eine der überraschendsten Ergebnisse der breiten klinischen Anwendung der Milzzintigraphie war die Feststellung, daß nur ein Viertel der sicher vergrößerten Milzen auch klinisch registriert wurden; drei Viertel der vergrößerten Milzen entzogen sich der klinischen Diagnose.

Die biologische Grundlage der Milzzintigraphie ist durch die Tatsache gegeben, daß künstlich erzeugte Sphärozyten selektiv in der roten Pulpa der Milz sequestriert werden. Artifizielle Sphärozyten erhält man, wenn normale Erythrozyten durch physikalische, chemische oder serologische Methoden alteriert werden (WINKELMAN et al. 1960, JOHNSON et al. 1960, WAGNER et al. 1963 und 1964).

Aus praktischen Gründen hat sich die Methode der wärmealterierten Erythrozyten für die szintigraphische Darstellung der Milz durchgesetzt.

Von weiterer Bedeutung ist, daß nur durch Wärme erzeugte Sphärozyten zu 100% bei einer Milzpassage aus dem die Milz durchströmenden Blut eliminiert werden. Dies macht es heute möglich, die spezifische Durchblutung der Milz exakt zu bestimmen und wenn man die Elimination von geschädigten Erythrozyten als Hauptaufgabe der Milz annimmt, auch ihre Funktion zu prüfen (FISCHER und WOLF 1966). Diese Autoren fanden eine spezifische Durchblutung der Milz von 5,2 ml/g/min. Sie ist demnach die höchste von allen Organen des menschlichen Körpers und liegt etwa um 40% höher, als die der Nieren.

Die Voraussetzung für alle diese neuen Untersuchungsmethoden ist der durch Wärme veränderte Erythrozyt, ein künstlicher Sphärozyt, der auch ganz andere biophysikalische Eigenschaften aufweist, als die normale bikonkave, rote Blutzelle. Es erscheint uns deshalb gerechtfertigt, die Frage zu stellen, ob diesen morphologischen Veränderungen ein entsprechendes, biochemisches Korrelat im Stoffwechsel der Zelle zukommt.

Der Stoffwechsel der Erythrozyten ist heute, dank der intensiven Forschungsarbeit einer großen Zahl von Wissenschaftlern, in vielen Punkten geklärt. In Deutschland sind insbesondere die hervorragenden Arbeiten von G.W.LÖHR und H.D.WALLER bekannt, die sich mit der Erythrozytenalterung, enzymopenischen hämolytischen Anämien, der Bedeutung einzelner Enzyme und mit dem Glutathion- und ATP-Stoffwechsel im Erythrozyten beschäftigen.

Zur Prüfung der Frage, ob für die besonderen Eigenschaften des wärmealterierten Erythrozyten wesentliche Veränderungen des Erythrozytenstoffwechsels verantwortlich sind, bestimmten wir die wichtigsten Enzyme der Glycolyse und des Pentosemonophosphatzyklus, den ATP-, ADP-, AMP-Gehalt und die Glutathionstabilität in den Erythrozyten.



Abbildung 1. Vergrößerte Milz bei chronisch-lymphatischer Leukämie.
Die charakteristischen Umriss der normalen Milz sind noch gewahrt.
Links: Rückenlage, Mitte: Seitenlage, rechts: Bauchlage des Patienten.
Die Abbildung wurde einer Arbeit von J.FISCHER 1965 entnommen.



Abbildung 2. Großer Tumor im linken Oberbauch, klinisch als Milz
tumorosus. Stündgrößenlicher Nachweis einer normal großen Milz an
normaler Stelle. Die Abbildung wurde derselben Arbeit entnommen wie
Abbildung 1.



METHODIK UND MATERIALIEN

I. WÄRMEALTERATION DER ERYTHROZYTEN

Sie wird in einem durch Präzisionsthermostaten geregelten Wasserbad, in dort bereits vorgewärmten, dickwandigen Zentrifugenröhrchen durchgeführt. In diese werden drei Milliliter einer Erythrozytensuspension pipettiert und einer Temperatur von $49,5^{\circ}\text{C}$ ausgesetzt. Nach einer Einwirkungsdauer von exakt 20 Minuten wird das Röhrchen herausgenommen und unter fließendem Wasser auf Zimmertemperatur wieder abgekühlt.

II. ENZYMATISCHE BESTIMMUNGEN IN ERYTHROZYTEN

Hierfür wurden folgende Substrate, Enzyme und Coenzyme von der Firma C.F.Böhringer & Söhne GmbH., Mannheim, bezogen.

Enzyme:

Enolase aus Kaninchenmuskel, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus Hefe, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel, Glycerin-1-Phosphat-Dehydrogenase/Triose-Phosphat-Isomerase aus Kaninchenmuskel, Lactat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel, 3-Phosphoglycerat-Kinase aus Hefe, Phosphoglycerat-Mutase aus Kaninchenmuskel.

Coenzyme:

Diphosphopyridinnucleotid (DPN), Diphosphopyridinnucleotid, reduziert (DPNH- Na_2), Triphosphopyridinnucleotid, reduziert (TPN- Na_2), Adenosin-5-Diphosphat (ADP- Na_3), Adenosin-5-Triphosphat (ATP- $\text{Na}_2\text{H}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$).

Substrate:

Fructose-1,6-Diphosphat (FDP- Na_3H), Glucose-6-Phosphat (G-6-P- Na_2), Phosphoenol-Pyruvat (PEP-3CHA), 6-Phosphogluconat (6-PG-3CHA), 2,3-Diphosphatglycerat (2,3-PGP-5CHA- $4\text{H}_2\text{H}$), 3-Phosphoglycerat (3-PG-3CHA- $3\text{H}_2\text{O}$), Na-Pyruvat, Glutathion (GSH), Glutathion-oxydiert (GSSG).

Ferner wurden folgende Reagentien benutzt: Human-Albumin, reinst (Behringwerke), Digitonin, kristallisiert (Merck AG., Darmstadt), Aethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (NaEDTA = Titriplex III), Triaethanolamin-Hydrochlorid, Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Kaliumchlorid (KCl), Na-

triumchlorid, kristallisiert zur Analyse, Magnesiumchlorid ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$),
D (+) Glucose.

Hergestellte Lösungen:

1. Trap-Puffer, $\text{pH} = 7,5$ (0,05 Mol) : 0,93 g Triäthanolamin-Hydrochlorid, 0,20 g Na-EDTA in 90 ml Aqua dest. lösen, mit 11 ml 1/n NaOH auf $\text{pH} = 7,5$ am pH-Meter (Radiometer, Copenhagen) einstellen und mit Wasser auf 100,0 auffüllen. pH-Wert nochmals prüfen.
2. 0,1 Mol MgCl_2 -Lösung: 2,033 g in 100 ml Aqua bidest.
3. 0,5 Mol MgSO_4 in 2,0 Mol KCl-Lösung: 6,162 g MgSO_4 , 7,456 g KCl in 50 ml Aqua bidest.
4. 0,5 Mol MgSO_4 -Lösung: 6,162 g MgSO_4 in 50 ml Aqua bidest.

Die Messungen wurden als optische Tests mit dem "Eppendorf-Photometer" bei einer Wellenlänge von 344 nm, in 10 mm-Küvetten, bei 25°C durchgeführt. Bei der Aktivitätsbestimmung von Enzymen mißt man die Geschwindigkeit des Substratumsatzes pro Zeiteinheit. Die Aktivität der DPN- und TPN-umsetzenden Dehydrogenasen erfaßt man aufgrund der unterschiedlichen Absorptionsspektren der reduzierten- und oxydierten-Pyridinnucleotide. Grundsätzlich wird bei Messungen der Enzymaktivitäten unter optimaler Substratkonzentration und Coenzymüberschuß gearbeitet. Die Enzymaktivitäten werden angegeben in internationalen Einheiten (IU). Eine IU ist definiert als die in einem Milliliter gelöste Enzymmenge, die bei 25°C, bei einer Küvettendicke von $d = 10$ mm und einer Wellenlänge von 366 nm ein Mikromol Substrat umsetzt. Dies entspricht einer Extinktionszunahme von 33,0 in einer Minute. Bei einer Extinktionsänderung von ΔE_{366} und einer Laufzeit von y Minuten ergeben sich:

$$\frac{\Delta E_{366} \cdot 1 \text{ Min.}}{y \cdot \text{Min.} \cdot 33,0 E_{366}} \quad \text{IU}$$

Die Enzymaktivität der Ausgangserythrozytensuspension ist aber um den Faktor der Verdünnung (F) größer. Dieser setzt sich aus der Verdünnung bei der Herstellung des Hämolyats (siehe unten) und aus der Verdünnung des Hämolyats im Testansatz (siehe Meßvorschriften für die Enzyme) zusammen.

$$F = \frac{v_f \cdot v_{kü}}{v_e}$$

v_f = Verdünnungsfaktor bei der Hämolyse

vkü = Volumen des Küvetteninhalts

ve = Volumen des Hämolyats im Testansatz

In einem Milliliter Erythrozytensuspension sind damit:

$$\frac{zE_{366} \cdot 1 \text{ Min.} \cdot vf \cdot vkü}{y \cdot \text{Min.} \cdot 33,0 E_{366} \cdot ve} \quad \text{IU}$$

von den beiden veränderlichen zE_{366} und y Minuten wird die Extinktionsänderung zE_{366} für das betreffende Enzym festgelegt und die Zeit y Minuten gemessen. Damit sind alle Größen in der Gleichung bekannt, und es lassen sich die IU berechnen. Üblicherweise werden die Erythrozytenenzymaktivitäten in IU pro 10^{11} Erythrozyten angegeben. Für diese Berechnung ist die Kenntnis der Erythrozytenzahl in einem Milliliter Ausgangslösung notwendig, die man nach Bestimmung in der Zeiss-Rosenthalkammer und Umrechnung erhält.

10^{11} Erythrozyten enthalten demnach:

$$\frac{zE_{366} \cdot 1 \text{ Min.} \cdot vf \cdot vkü \cdot 10^{11}}{y \text{ Min.} \cdot 33,0 E_{366} \cdot ve \cdot \text{Erythrozytenzahl in 1 ml Ausgangssuspension}}$$

Herstellung einer Erythrozytenausgangssuspension zur intraerythrozytären Fermentbestimmung (LÖHR, WALLER und KARGES 1957)

Zitratblut (1 ml Zitrat auf 10 ml Blut) dreimal in physiologischer Kochsalzlösung waschen, indem man das Blut bei 2000 Touren 5 Minuten zentrifugiert, den Serumüberstand vorsichtig abpipettiert und durch physiologische Kochsalzlösung ersetzt. Durch vorsichtiges Wenden des Reagenzglases resuspendiert man den Erythrozytenbodensatz wieder. Der Waschvorgang wird zweimal wiederholt. Nach dem letzten Waschen stellt man die Erythrozytenzahl in der Suspension durch entsprechende Zugabe von physiologischer Kochsalzlösung auf ungefähr zwei Millionen ein. Die Erythrozytenzahl wird zweimal in der Zeiss-Rosenthalkammer gezählt.

Nach Wärmealteration der Erythrozyten ist es nicht mehr exakt möglich, die Erythrozyten zu zählen, da diese zum Teil fragmentiert und zusammengeballt sind. Eine genaue Erythrozyten-Zählung ist aber unbedingte Voraussetzung für den Vergleich der Enzymaktivitäten vor und nach der Hitzeeinwirkung. Mit der Methode des gleichzeitig durchgeführten, quantitativen Waschvor-

gangs von nicht alteriertem und wärmealteriertem Blut ist es möglich, die Erythrozytenzählung auf das nicht alterierte Blut zu beschränken, denn die Erythrozytenzahl gilt repräsentativ auch für das vor dem Waschvorgang im Serum und für das nach dem Waschvorgang in Kochsalzlösung wärmealterierte Blut. Der nebeneinander durchgeführte, quantitative Waschvorgang wird folgendermaßen durchgeführt:

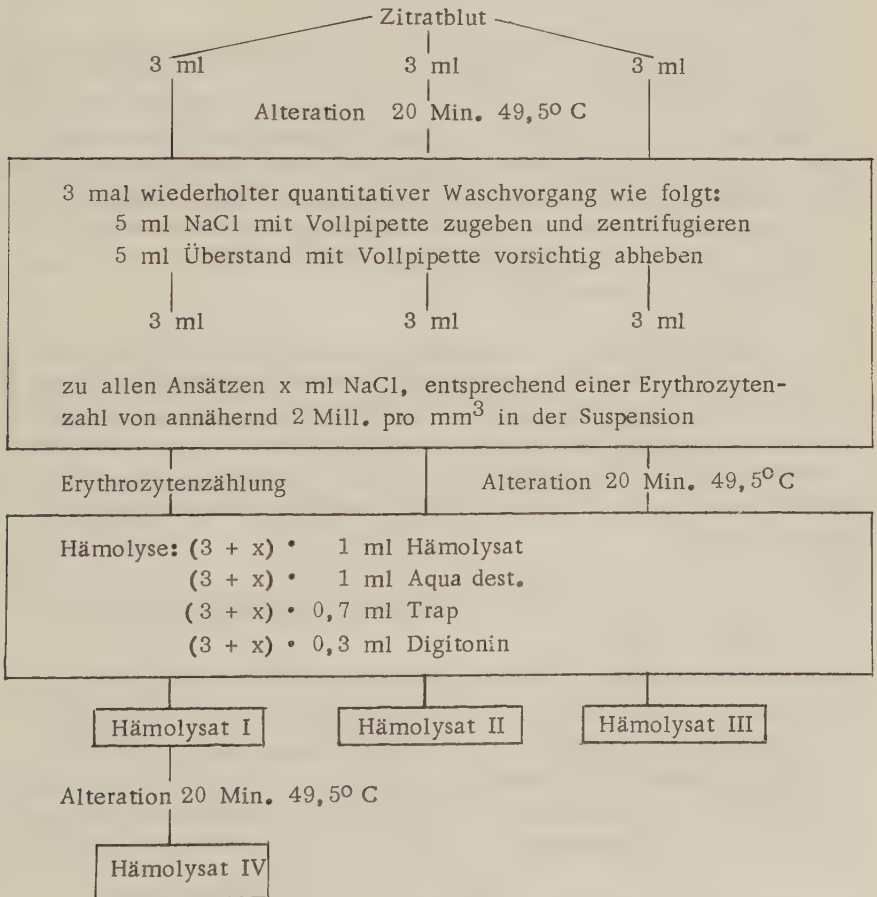
1. Es werden jeweils 3 ml Zitratblut mit einer Vollpipette in drei Zentrifugenröhrchen gegeben. Im ersten Röhrchen wird das Blut als Bezugssystem nicht der Wärme ausgesetzt. Im zweiten Röhrchen wird das Blut vor dem Waschvorgang, also im Serum, mit Wärme behandelt (siehe oben bei Wärmealteration der Erythrozyten). Das Blut im dritten Röhrchen wird erst nach dem Waschvorgang mit Wärme behandelt.
2. Vor dem Waschen wird zu jedem Röhrchen mit einer Vollpipette 5 ml 0,9% NaCl gegeben. Das Röhrchen wird einige Male umgeschüttelt und bei 2000 Touren 5 Minuten zentrifugiert.
3. Nach dem Zentrifugieren wird bei allen Ansätzen wieder mit derselben Vollpipette 5 ml Überstand abpipettiert und durch dieselbe Menge 0,09% NaCl ersetzt. Der Vorgang wird zweimal wiederholt.
4. Nach Abpipettieren der 5 ml Überstand bei allen Röhrchen nach dem letzten Waschvorgang haben diese wieder ihr Ausgangsvolumen von 3 ml. Dieses wird jetzt durch Zugabe jeweils der gleichen Menge von 0,9% NaCl auf ein Volumen aufgefüllt, das grob einer Erythrozytenzahl in der Suspension von zwei Millionen pro mm^3 entspricht. Es werden aber nur jeweils ganze ml von 0,9% NaCl hinzugegeben. Dies ist für die anschließende Herstellung des Erythrozytenhämolysats zur intraerythrozytären Fermentbestimmung (siehe unten) notwendig.
5. Die Erythrozyten werden im nicht alterierten Ansatz gezählt. Die erhaltene Erythrozytenzahl gilt repräsentativ auch für die wärmealterierten Ansätze.

Herstellung des Hämolysats (LÖHR, WALLER und KARGES 1957)

Zu 1 ml Erythrozytensuspension werden 1 ml Aqua dest., 0,7 ml Trap ($\text{pH} = 7,5$) und 0,3 ml gesättigte Digitoninlösung gegeben. Die Mischung wird 15 Minuten bei 40°C hämolysiert, danach 15 Minuten bei 2000 Touren zentrifugiert, der Überstand abgenommen und zum Test verwendet. In unserem Falle wird das Hämolysat aus den vollen, durch Waschung erhaltenen Ansätzen von alteriertem und nicht alteriertem Blut (siehe oben, quantitativer Wasch-

vorgang) hergestellt. Damit wurden die Fehlerquellen durch Erythrozytenzusammenballungen bei Entnahme von jeweils nur 1 ml Suspension aus den betreffenden Ansätzen vermieden. Auf einen 5 ml Ansatz z.B. kommen also 5 ml Aqua dest., 3,5 ml Trap (pH = 7,5) und 1,5 ml gesättigte Digoninlösung.

Der nebeneinander durchgeführte quantitative Waschvorgang von alteriertem und nicht alteriertem Blut mit anschließender Hämolyse werden in Darstellung 1 gezeigt.



Darstellung 1: Herstellung der Erythrozytenhämolsate mit vorangegehendem quantitativen Waschvorgang. In allen Ansätzen befindet sich die gleiche Ery-

throzytenzahl in gleichen Volumina. Man erhält vier verschiedene Hämolyse: Hämolysat I - keine Wärmealteration, Hämolysat II - Wärmealteration im Serum, Hämolysat III - Wärmealteration in NaCl und Hämolysat IV - Wärmealteration im Hämolysat.

Testvorschriften für die Bestimmung der intraerythrozytären Enzyme

1. Hexokinase (GRIGNANI und LÖHR 1960):

Der Testansatz enthält 1,30 ml Trap (pH = 7,5), 1,20 ml Glucose in Trap (100 mg/1 ml Trap), 0,20 ml $MgCl_2$ (0,1 Mol), 0,20 ml TPN (10 mg/ml), 0,1 ml G-6-PDH (Verdünnung 0,1 G-6-PDH + 0,4 Wasser), 0,10 ml Erythrozytenhämolysat. Man wartet ab, bis die Extinktion steht und gibt dann 0,1 ml ATP (10 mg/ml) zu. Die Extinktionsänderung wird erst dann abgelesen, wenn 0,01 abgelaufen ist. Danach stoppt man die Zeit für eine Extinktionsänderung von 0,025.

2. Aldolase (RACKER 1947):

Der Testansatz enthält 2,85 ml Trap (pH = 7,5), 0,05 ml DPN (10 mg/ml), 0,02 ml GDH/TIM-Mischung (Glycerophosphatdehydrogenase + Triosephosphatisomerase: 2 mg/ml), 0,10 ml Hämolysat. Man wartet ab, bis die Extinktion steht. Danach gibt man 0,05 ml FDP (Fructose-1,6-Diphosphat, Na-Salz) in einer Konzentration von 30 mg/ml Aqua dest. dazu. Nach einem Vorlauf von 0,025 wird zweimal die Zeit der Extinktionsänderung von 0,025 gestoppt.

3. Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (DELBRÜCK, ZEBE und BÜCHER 1959):

Der Testansatz enthält 2,58 ml Trap (pH = 7,5), 0,10 ml 3-PGS (50 mg/ml), 0,04 ml $MgSO_4$ (0,5 Mol), 0,01 ml PGK (1 mg/ml), 0,05 Hämolysat, 0,05 ml DPNH (10 mg/ml), 0,10 ml Glutathion reduziert (30,7 mg/ml, pH auf 7,5 einstellen). Danach gibt man 0,2 ml ATP (20 mg/ml) dazu. Nach einem Vorlauf von 0,05 wird mehrmals die Zeit für eine Extinktionsänderung von 0,05 abgestoppt.

4. Phosphoglyceratkinase (VOGELL, BISHAI, BÜCHER, KLINGENBERG, PETTE und ZEBE 1959):

Der Testansatz enthält 2,57 ml Trap ($\text{pH} = 7,5$), 0,05 ml DPNH (10 mg/ml), 0,10 ml 3-Phosphoglycerat (50 mg/ml), 0,04 ml MgSO_4 (0,5 Mol), 0,02 ml GAPDH (5 mg/ml), 0,05 ml Hämolytat, 0,10 ml Glutathion reduziert (30 mg/ml, pH auf 7,5 einstellen). Man wartet ab, bis die Extinktion steht, und startet die Reaktion mit 0,2 ml ATP (20 mg/ml). Nach einem Vorlauf von 0,05 wird mehrmals die Zeit für eine Extinktionsänderung von 0,05 abgestoppt.

5. Phosphoglyceromutase I (VOGELL et al 1959):

Der Testansatz enthält 2,48 ml Trap ($\text{pH} = 7,5$), 0,15 ml $\text{Mg SO}_4/\text{KCl}$ (0,5 Mol $\text{MgSO}_4/2,0$ Mol KCl -Lösung), 0,10 ml ADP (15 mg/ml), 0,07 ml DPNH_2 (10 mg/ml), 0,05 ml Hämolytat, 0,04 ml PK (2 mg/ml), 0,02 ml LDH (2 mg/ml), 0,01 ml Enolase (10 mg/ml). Man wartet ab, bis die Extinktion steht, und startet die Reaktion mit 0,1 ml 3-PGS (50 mg/ml). Nach einem Vorlauf von 0,025 wird zweimal die Zeit für eine Extinktionsänderung von 0,025 abgestoppt.

6. Phosphoglyceromutase II mit 2,3-Di-PGS (VOGELL et al 1959):

Der Testansatz enthält 2,44 ml Trap ($\text{pH} = 7,5$), 0,04 ml 2,3-Di-PGS (42 mg/ml 2,3-PGS), 0,15 ml MgSO_4/KCl (0,5 Mol MgSO_4 in 2,0 Mol KCl -Lösung), 0,10 ml ADP (15 mg/ml), 0,07 ml DPNH (10 mg/ml), 0,05 ml Hämolytat, 0,04 PK (2 mg/ml), 0,02 ml LDH (2 mg/ml), 0,01 ml Enolase (10 mg/ml). Man wartet ab, bis die Extinktion steht, und startet die Reaktion mit 0,1 ml 3-PGS (50 mg/ml). Nach einem Vorlauf von 0,025 wird zweimal die Zeit für eine Extinktionsänderung von 0,025 abgestoppt.

7. Enolase (BOCK, KARGES, LÖHR und WALLER 1958):

Der Testansatz enthält 1,54 ml Trap ($\text{pH} = 7,5$), 0,15 ml MgSO_4/KCl , (0,5 Mol MgSO_4 in 2,0 Mol KCl -Lösung), 0,20 ADP (15 mg/ml), 0,02 ml LDH, 0,02 ml PK, 0,05 ml Hämolytat, 0,02 ml DPNH (10 mg/ml). Man startet die Reaktion mit 0,1 ml 2-PGS (20 mg/ml). Nach einem Vorlauf wird die Zeit für eine Extinktionsänderung von 0,05 abgestoppt.

8. Pyruvatkinase (BOCK, KARGES, LÖHR und WALLER 1958):

Der Testansatz enthält 1,55 ml Trap ($\text{pH} = 7,5$), 0,02 ml DPNH (10 mg/ml),

0,20 ml ADP (15 mg/ml), 0,15 ml MgSO_4/KCl , 0,04 ml LDH (2 mg/ml), 0,05 ml Hämolysat. Man startet die Reaktion mit 0,10 ml PEP (15 mg/ml). Nach einem Vorlauf wird zweimal die Zeit für eine Extinktionsänderung von 0,05 abgestoppt.

9. Lactat-Dehydrogenase (KUBOWITZ und OTT 1943):

Der Testansatz enthält 1,96 ml Trap ($\text{pH} = 7,5$), 0,02 ml Hämolysat, 0,02 ml DPNH (10 mg/ml). Man startet die Reaktion mit 0,10 ml Na-Pyruvat (100 mg/25 ml). Es wird zweimal die Zeit für eine Extinktionsänderung von 0,050 nach Vorlauf abgestoppt.

10. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (KORNBERG und HORECKER 1955):

Der Testansatz enthält 2,80 ml Trap ($\text{pH} = 7,5$), 0,10 ml Hämolysat, 0,05 ml TPN (25 mg/ml). Es wird zwei Minuten abgewartet, und die Reaktion gestartet mit 0,05 ml G-6-Phosphat (30 mg/ml). Es wird zweimal die Zeit für eine Extinktionsänderung von 0,025 nach Vorlauf abgestoppt.

11. 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (HORECKER und SMYRNIOTIS 1951):

Der Testansatz enthält 2,80 ml Trap ($\text{pH} = 7,5$), 0,10 ml Hämolysat, 0,10 ml TPN (25 mg/ml). Man startet die Reaktion mit 0,05 ml 6-Phosphogluconat (30 mg/2 ml). Es wird die Zeit für eine Extinktionsänderung von 0,025 nach Vorlauf abgestoppt.

12. Glutathionreduktase (RACKER 1955):

Der Testansatz enthält 2,55 ml Trap ($\text{pH} = 7,5$), 0,15 ml Albumin-Lösung (15 mg/1 ml Trap), 0,10 ml Hämolysat (bei Erythrozytenzahl über 2,2 Millionen nur 0,05 einsetzen), 0,10 ml TPNH (10 mg/ml). Man startet die Reaktion sofort mit 0,2 ml GSSG (60 mg/ml in Aqua dest., die NaOH auf $\text{pH}=7,5$ einstellen). Es wird die Zeit für eine Extinktionsänderung von 0,025 abgestoppt.

III. ADENOSINTRIPHOSPHATBESTIMMUNG IN ERYTHROZYTEN (BÜCHER und PFLEIDERER unveröffentlicht, angegeben bei WALLER, LÖHR und TABATABAI 1957):

Der Test ist heute in fertiger Zusammenstellung als "ATP-Test" von der Firma Böhringer & Söhne, Mannheim, zur Bestimmung im "Eppendorf-Photometer", bei 366 nm lieferbar. Er wird folgendermaßen durchgeführt: 3 ml Vollblut werden mit 3 ml eiskalter 6% Perchlorsäure (6 ml 70% Perchlorsäure auf 100 ml Aqua dest.) enteiweißt. Die Flüssigkeit wird mit einem Plastikspatel gut gemischt und homogenisiert. Der Eiweißniederschlag wird zehn Minuten bei etwa 3000 Touren in der Minute zentrifugiert. Der Überstand ist die Testlösung mit dem gelösten ATP. Das Reaktionsschema zur ATP-Bestimmung entspricht der Phosphoglyzeratkinase-Reaktion. Es wird bei einer Wellenlänge von 366 nm und einer Küvettendicke von 1 cm Schichtdicke bei 25,5° C gegen Luft gemessen. Der Testansatz enthält 2,50 ml 0,1 Mol Triäthanolaminpuffer pH = 7,6 mit 0,004 Mol MgSO_4 und 0,006 Mol 3-PG, 0,05 ml 0,012 Mol DPNH, 0,20 ml Überstand nach Enteiweißung. Es wird mit einem Plastikspatel gut gemischt und die Extinktion E_1 gemessen. Nun werden 0,05 ml GAPDH (4 mg/ml) / PGK (1 mg/ml) zugegeben und nach fünf Minuten die Extinktion E_2 gemessen. Es ergibt sich nun:

$$E_1 - E_2 = E_{366}$$

Der ATP-Gehalt errechnet sich unter Berücksichtigung eines Verdünnungsfaktors entsprechend oben angegebener Versuchsvorschrift nach der Gleichung:

$$E_{366} \cdot 396 = \text{mg \% ATP im Vollblut}$$

IV. ADENOSINDIPHOSPHAT- UND ADENOSINMONOPHOSPHATBESTIMMUNG IN ERYTHROZYTEN (ADAM und BUCHER 1955)

Die Bestimmung von ADP und AMP wird enzymatisch im Vollblut durchgeführt. Der Test ist heute ebenfalls in fertiger Zusammenstellung als "ADP-AMP-Test" von der Firma Böhringer & Söhne, Mannheim, zur Bestimmung im "Eppendorf-Photometer", bei 366 nm lieferbar. Er wird folgendermaßen durchgeführt: 5 ml Vollblut werden in einem 10 ml Zentrifugenglas mit 5 ml eiskalter 6% Perchlorsäure (6 ml 70% Perchlorsäure auf 100 ml Aqua dest.) enteiweißt. Die Flüssigkeit wird mit einem Plastikspatel gut gemischt und homogenisiert. Der Eiweißniederschlag wird zehn Minuten bei etwa 3000 Touren in

der Minute abzentrifugiert. Der Überstand ist die Testlösung mit dem gelösten ADP und AMP. Es wird bei einer Wellenlänge von 366 nm und einer Küvetten-
dicke von 1 cm Schichtdicke bei 25,50°C gegen Luft gemessen. Es werden 4 ml
Überstand und 1,0 ml 0,43 Mol Triäthanolamin-HCl-0,55 Mol K₂CO₃ ge-
mischt, zehn Minuten ins Eisbad gestellt und filtriert. Das Filtrat wird auf 250°C
gebracht. Der Testansatz enthält 2,00 ml Filtrat, 0,15 ml 0,01 Mol Phospho-
enol-Pyruvat/1,3 Mol KCl/0,4 Mol MgSO₄, 0,10 ml 0,009 Mol DPNH. Der
Ansatz wird mit einem Plastikspatel gemischt und die Extinktion E₁ nach fünf
Minuten gemessen. Nun werden 0,02 ml PK-Lösung (1 mg/ml) eingemischt
und es wird nach fünf Minuten die Extinktion E₂ gemessen. Zur genaueren End-
wertbestimmung sind 3 bis 5 weitere Ablesungen im Abstand von je einer Minu-
te durchzuführen und E₂ auf die Zeit der Zugabe von PK-Lösung zu extrapolie-
ren. Danach werden 0,02 ml MK-Lösung (2 mg/ml) dazu gemischt und es
wird nach zehn Minuten die Extinktion E₃ gemessen. Unter Berücksichtigung
eines Verdünnungsfaktors entsprechend oben angegebener Versuchsvorschrift
berechnet sich der ADP-Gehalt nach der Gleichung:

$$(E_1 - E_2) \text{ 366 nm } \cdot 34,5 = \text{mg \% ADP im Vollblut}$$

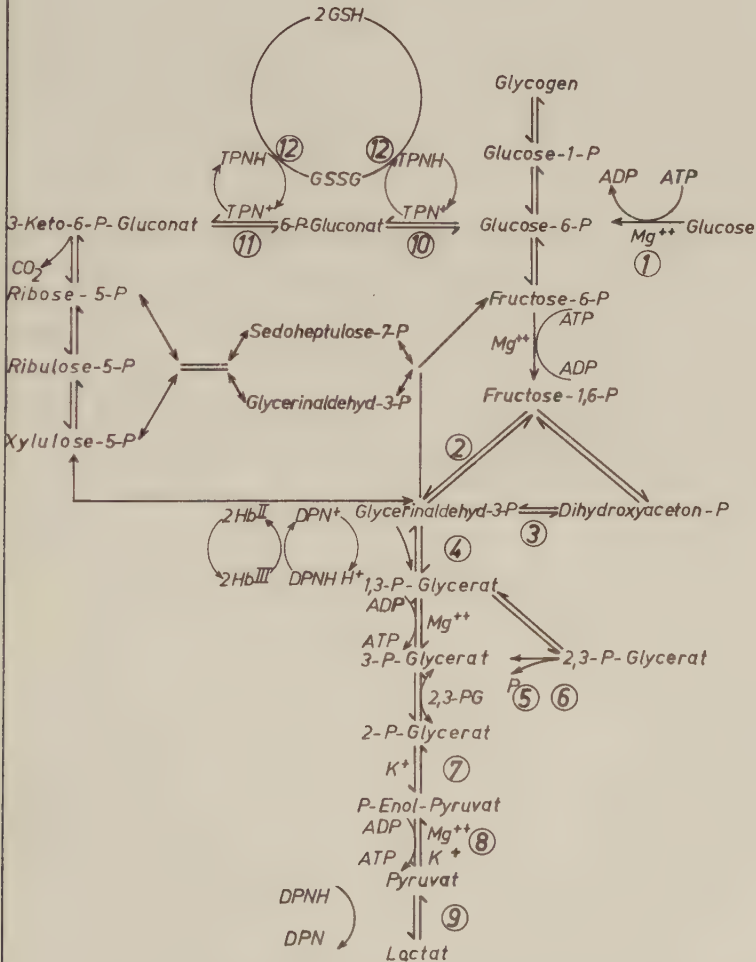
und der AMP-Gehalt nach der Gleichung:

$$(E_2 - E_3) \text{ 366 nm } \cdot 14,0 = \text{mg \% AMP im Vollblut}$$

V. GLUTATHIONSTABILITÄT IN NORMALEN UND WÄRMEALTERIERTEN ERYTHROZYTEN (BEUTLER 1957):

Der Test beruht auf der Glutathionbestimmung in Erythrozyten vor und nach
Belastung des Glutathion reduzierenden Systems mit beta-Acetylphenylhydrazin.
Es wurden folgende Substrate und Lösungen verwendet: 3% Meta-Phosphorsäure,
NaCl pro Analyse, 2% Na-Nitroprussid (stets direkt vor Gebrauch ansetzen),
0,0067 Mol NaCN/0,15 Mol Na₂CO₃-Lösung, gesättigte NaCl-Lösung, ge-
sättigte Digitonin-Lösung und beta-Acethylphenylhydrazin. Die Bestimmungen
wurden durchgeführt im "Eppendorf-Photometer" bei einer Wellenlänge von
546 nm in einer Glasküvette mit einer Schichtdicke von 2 cm. Es werden vier
Zentrifugenröhrchen, R I, R II, R III und R IV mit jeweils 3 ml Zitratblut wie
folgt behandelt: Zunächst werden die Röhrchen R III und R IV für zwanzig Minu-
ten auf 49,50°C (siehe Wärmealteration der Erythrozyten) erwärmt. In die
Röhrchen R II und R IV gibt man nun jeweils 15 mg beta-Acethylphenylhydrazin
zur Belastung des Glutathion reduzierenden Systems im Erythrozyten hinzu.

Abbildung 3



Schematische Darstellung der Glykolyse, des Hexosemonophosphatcyclus, des Glutathion reduzierenden Systems und der ATP-Bildung nach Löhner und Waller (1959).

Alle Röhrchen werden nun drei Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach werden sie auf folgende Weise weiterbehandelt: Man gibt zu den 3 ml Zitratblut zur Hämolyse 5,1 ml Aqua bidest. und 0,9 ml gesättigte Digitonin-Lösung. Nach fünf Minuten gibt man zum Hämolysat 9,0 g NaCl und 15 ml 3% Metaphosphorsäure, schüttelt zehn Minuten und homogenisiert mit einem Glasstab. Danach filtriert man das Homogenat durch einen Papierfilter. Der Testansatz enthält 1 ml Filtrat und 3 ml gesättigte NaCl-Lösung. Nach zehn Minuten überschichtet man mit 1,0 ml 2% Na-Nitroprussid-Lösung. Nach Zugabe von 1,0 ml NaCH- Na_2CO_3 -Lösung wird nach einer Minute die Extinktion abgelesen. Es wird in dem gleichen Photometereinsatz noch ein Leerwert bestimmt, der statt 1 ml Filtrat 1,0 ml 3% Metaphosphorsäure enthält, ansonsten aber genau so behandelt wird wie der Testansatz. Nach der Subtraktion der Extinktion des Leerwertes von der des Testansatzes ergibt sich eine Extinktionsdifferenz, die dem Glutathiongehalt des Ansatzes direkt proportional ist. In unserem Zusammenhang interessiert weniger der absolute Glutathiongehalt als die Glutathionstabilität. Setzt man die Extinktion E I bzw. E III ohne Belastung mit beta-Acetylphenylhydrazin gleich 100%, so ist die Glutathionstabilität definiert als der Abfall der Extinktion E II bzw. E IV in Prozent von E I und E III nach Belastung mit beta-Acetylphenylhydrazin. Für unsere Fragestellung ist der Vergleich vor und nach Wärmealteration wichtig.

VERSUCHE UND ERGEBNISSE

Den Versuchen und Ergebnissen sei zur Orientierung über den Kohlenhydratstoffwechsel des Erythrozyten ein Schema (Abbildung 3), vorangestellt (LÖHR und WALLER 1959). Es zeigt die Enzymketten der Glycolyse und des Pentosemonophosphatzylus, das Glutathion reduzierende System und die ATP-bildenden Reaktionen. Die auf ihre Veränderungen nach Wärmealteration untersuchten Enzyme sind in der Abbildung 3 mit den umrandeten Ziffern 1 bis 12 angegeben. Sie entsprechen den in der Tabelle 1 und Tabelle 2 in derselben Reihenfolge aufgeführten Enzymen.

Tabelle 1: Enzyme mit den von LÖHR und WALLER angegebenen Normalwerten in IU/10¹¹ Erythrozyten:

1	Hexokinase	1,7	±	0,3
2	Di-P-Fructose-Aldolase	5,0	±	0,5
3	Glycerinaldehyd-3-P-DHG	212,0	±	31,2
4	3-P-Glycerat-1-Kinase	297,0	±	33,2
5	P-Glycerat-Mutase I	18,1	±	5,8
6	P-Glycerat-Mutase II	75,2	±	10,9
7	Enolase	37,5	±	3,7
8	Pyruvat-Kinase	41,7	±	6,3
9	Lactatdehydrogenase	270,0	±	36,7
10	Glucose-6-P-DHG	17,1	±	2,3
11	6-P-Gluconat-DHG	7,7	±	0,8
12	Glutathion-Reduktase (TPNH)	11,7	±	2,3

Es wurden die Enzymaktivitäten in Erythrozyten vor und nach Wärmealteration bei 49,5°C für zwanzig Minuten gemessen. Der Verlust der Enzymaktivitäten nach Wärmealteration der Erythrozyten im Serum, also in ihrem physiologischen Milieu, ist in der Tabelle 2 in Prozent Aktivitätsverlust der Ausgangsaktivität in nicht wärmealterierten Erythrozyten angegeben.

Tabelle 2: Bestimmung der Enzymaktivitäten in Erythrozyten vor und nach Wärmealteration im Serum.
Der Abfall der Enzymaktivität ist ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität vor der Wärmealteration.

Enzyme	Abfall der Ausgangsaktivität in Prozent, arithmetischer Mittelwert aus 24 Messungen	Konfidenzbereich für Mittelwert der Grundgesamtheit $P < 0,01$	t-Wert, signifikante t-Werte sind unterstrichen
1 Hexokinase	6,6	$\pm 0,8$	<u>24,1</u>
2 Di-P-Fructose-Aldolase	1,5	$\pm 0,7$	<u>6,1</u>
3 Glycerinaldehyd-3-P-DHG	1,1	$\pm 0,8$	<u>3,8</u>
4 3-P-Glycerat-1-Kinase	5,0	$\pm 0,9$	<u>15,7</u>
5 P-Glycerat-Mutase I	2,8	$\pm 0,7$	<u>11,3</u>
6 P-Glycerat-Mutase II	0,6	$\pm 0,7$	2,5
7 Endolase	17,7	$\pm 1,1$	<u>46,4</u>
8 Pyruvat-Kinase	4,3	$\pm 0,7$	<u>17,7</u>
9 Lactatdehydrogenase	0,5	$\pm 0,7$	2,3
10 Glucose-6-P-DHG	71,8	$\pm 1,1$	<u>177,7</u>
11 6-P-Gluconat-DHG	1,3	$\pm 0,7$	<u>5,4</u>
12 Glutathion-Reduktase (TPNH)	2,5	$\pm 0,8$	<u>9,0</u>

Vergleicht man die Aktivitätsverluste der gemessenen Enzyme miteinander, so lassen sie sich nach abnehmender Stabilität gegenüber Wärmeeinwirkung etwa folgendermaßen ordnen: Unter den zwölf untersuchten Enzymen zeigten die folgenden sieben Enzyme die größte Stabilität: Di-P-Fructose-Aldolase,

Glycerinaldehyd-3-P-DHG, P-Glycerat-Mutase I, P-Glycerat-Mutase II, Lactatdehydrogenase, 6-P-Gluconat-DHG und Glutathionreduktase.

Eine etwas geringere, aber doch untereinander etwa gleichgroße Stabilität zeigen die drei Kinasen: Hexokinase, 3-P-Glycerat-1-Kinase und Pyruvatkinase. Die Enolase weist dagegen eine deutlich geringere Stabilität auf. Den größten Aktivitätsverlust und damit die geringste Stabilität zeigt die Glucose-6-P-DHG. Die Stabilität der Glucose-6-P-DHG wurde deshalb in weiteren Temperaturbereichen von 35,5° C bis 51,5° C ansteigend im Abstand von 2° C untersucht. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3 und die dazugehörige graphische Darstellung in der Abbildung 4 zusammengefaßt.

Tabelle 3: Bestimmung der Enzymaktivität der Glucose-6-P-Dehydrogenase vor und nach Wärmealteration bei verschiedenen Temperaturen. Der Abfall der Enzymaktivität ist ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität vor der Wärmealteration.

Glucose-6-P-Dehydrogenase bei verschiedenen Temperaturen für 20 Minuten	Abfall der Ausgangsaktivität in Prozent, arithmetischer Mittelwert aus 10 Messungen	Konfidenzbereich für Mittelwert der Grundgesamtheit $P < 0,01$	t-Wert, signifikante t-Werte sind unterstrichen
35,5° C	0,1	$\pm 0,8$	0,4
37,5° C	0,4	$\pm 0,9$	1,5
39,5° C	1,2	$\pm 0,8$	<u>4,8</u>
41,5° C	4,9	$\pm 0,8$	<u>21,1</u>
43,5° C	13,9	$\pm 1,2$	<u>36,8</u>
45,5° C	32,7	$\pm 1,4$	<u>77,5</u>
47,5° C	53,7	$\pm 1,4$	<u>123,3</u>
49,5° C	71,8	$\pm 1,1$	<u>177,7</u>
51,5° C	84,0	$\pm 1,8$	<u>156,4</u>

Man sieht, daß die Stabilität bei physiologischen Temperaturen, also 37,5° C, wie zu erwarten war, nicht verändert ist. Bei 39,5° C und bei 41,5° C deutet sich zunächst ein geringer Aktivitätsverlust an, der bei 43,5° C schon deutlich wird. Von 43,5° C bis 49,5° C fällt die Aktivität fast linear auf $28,2 \pm 1,1$ Prozent der Ausgangsaktivität ab, um bei 51,5° C nur noch eine Restaktivität von $16,0 \pm 1,8$ Prozent zu zeigen.

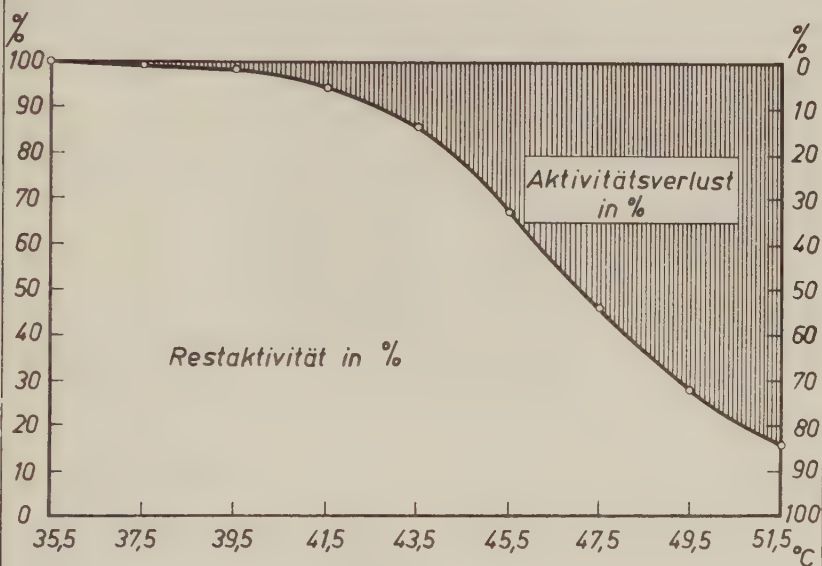


Abbildung 4

Graphische Darstellung des Aktivitätsverlustes der Glucose-6-P-Dehydrogenase bei Einwirkung verschiedener Temperaturen auf Erythrozyten im Serum für 20 Min..

In der Tabelle 4 sieht man das Verhalten der Enzymaktivitäten, wenn die Erythrozyten in 0,9% NaCl der definierten Wärmeeinwirkung von 49,5°C für zwanzig Minuten ausgesetzt werden. Sie zeigt, daß im Vergleich zur Alteration der Erythrozyten im Serum die Stabilität der Enzyme durchweg geringer ist. Aber auch hier läßt sich die oben aufgestellte Ordnung nach der Stabilität in derselben Reihenfolge mit geringer Abweichung aufrecht erhalten.

Tabelle 4: Bestimmung der Enzymaktivitäten in Erythrozyten vor und nach Wärmealteration in 0,9% NaCl. Der Abfall der Enzymaktivität ist ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität vor der Wärmealteration.

Enzyme	Abfall der Ausgangsaktivität in Prozent, arithmetischer Mittelwert aus 10 Messungen	Konfidenzbereich für Mittelwert der Grundgesamtheit $P < 0,01$	t-Wert, signifikante t-Werte sind unterstrichen
1 Hexokinase	24,1	$\pm 1,5$	<u>52,5</u>
2 Di-P-Fructose-Aldolase	4,1	$\pm 1,6$	<u>8,5</u>
3 Glycerinaldehyd-3-P-DHG	2,1	$\pm 1,0$	<u>6,7</u>
4 3-P-Glycerat-1-Kinase	8,8	$\pm 1,2$	<u>24,6</u>
5 P-Glycerat-Mutase I	3,8	$\pm 1,5$	<u>8,2</u>
6 P-Glycerat-Mutase II	1,4	$\pm 1,3$	<u>3,5</u>
7 Enolase	29,2	$\pm 1,2$	<u>81,6</u>
8 Pyruvat-Kinase	9,1	$\pm 1,0$	<u>29,1</u>
9 Lactatdehydrogenase	0,7	$\pm 1,0$	<u>2,3</u>
10 Glucose-6-P-DHG	74,7	$\pm 1,5$	<u>158,3</u>
11 6-P-Gluconat-DHG	2,5	$\pm 1,0$	<u>8,1</u>
12 Glutathion-Reduktase (TPNH)	3,4	$\pm 1,1$	<u>10,0</u>

Die größte, aber insgesamt eine etwas geringere Stabilität zeigen die gleichen sieben Enzyme, die auch bei Alteration im Serum die größte Stabilität aufwiesen. Eine deutlich geringere Stabilität zeigen wieder die Kinasen, wobei die Hexokinase sich von den beiden anderen Kinasen, der 3-P-Glycerat-1-Kinase und der Pyruvatkinase doch durch ihren erheblicheren Aktivitätsverlust

unterscheidet. Die Enolase zeigt auch hier eine deutlich geringere Stabilität. Ähnlich wie im Serummilieu zeigt die Glucose-6-P-DHG auch bei Alteration in physiologischer NaCl die geringste Stabilität unter den untersuchten zwölf Enzymen.

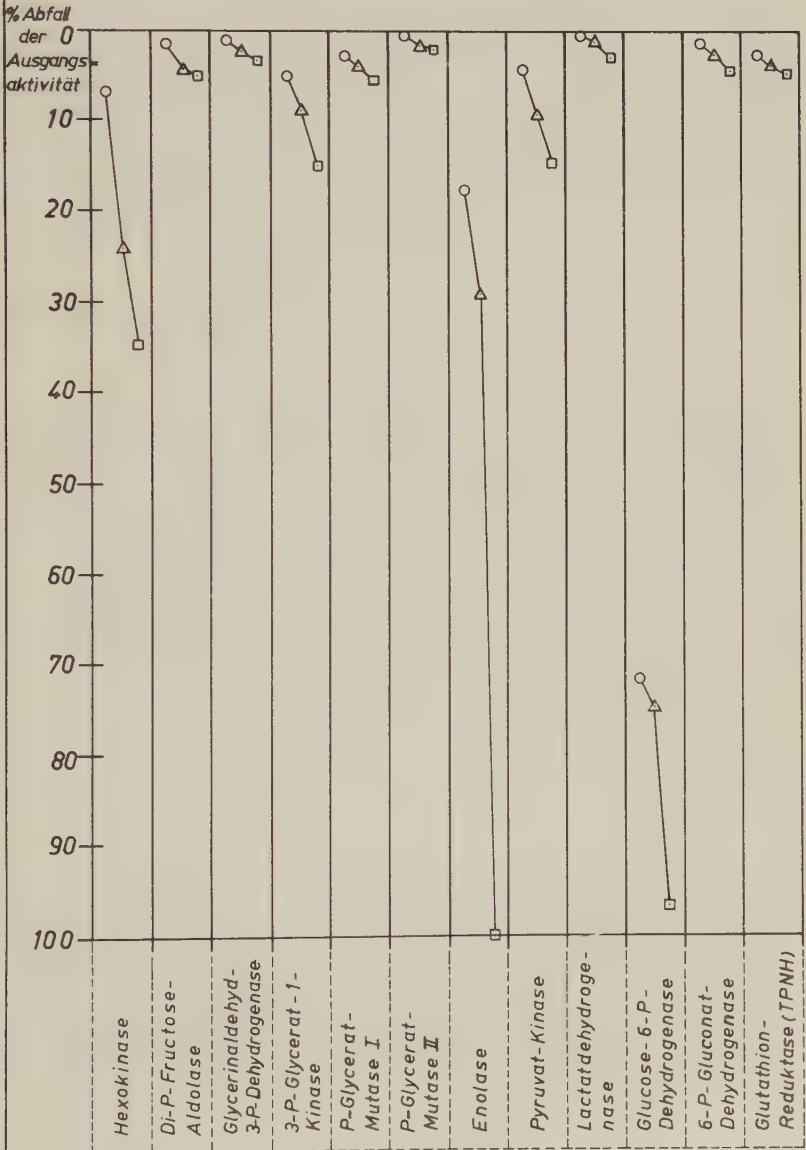
Tabelle 5: Bestimmung der Enzymaktivitäten im Hämolsat vor und nach Wärmealteration des Hämolsats. Der Abfall der Enzymaktivitäten ist ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität vor der Wärmealteration.

Enzyme	Abfall der Ausgangsaktivität in Prozent, arithmetischer Mittelwert aus 10 Messungen	Konfidenzbereich für Mittelwert der Grundgesamtheit $P < 0,01$	t-Wert, signifikante t-Werte sind unterstrichen
--------	---	--	---

1 Hexokinase	34,9	$\pm 1,4$	<u>80,6</u>
2 Di-P-Fructose-Aldolase	4,7	$\pm 1,0$	<u>15,7</u>
3 Glycerinaldehyd-3-P-DHG	3,2	$\pm 1,6$	<u>8,9</u>
4 3-P-Glycerat-1-Kinase	15,0	$\pm 1,4$	<u>35,6</u>
5 P-Glycerat-Mutase I	5,3	$\pm 1,0$	<u>17,7</u>
6 P-Glycerat-Mutase II	1,6	$\pm 0,9$	<u>6,0</u>
7 Enolase	100,0	$\pm 0,0$	<u>0,0</u>
8 Pyruvat-Kinase	14,6	$\pm 1,1$	<u>43,1</u>
9 Lactatdehydrogenase	2,8	$\pm 1,5$	<u>6,0</u>
10 Glucose-6-P-DHG	96,8	$\pm 1,8$	<u>172,4</u>
11 6-P-Gluconat-DHG	5,3	$\pm 1,2$	<u>14,5</u>
12 Glutathion-Reduktase (TPNH)	4,5	$\pm 0,9$	<u>16,8</u>

Die Tabelle 5 zeigt die Empfindlichkeit der einzelnen Enzyme, wenn sie, herausgelöst aus ihrer örtlichen und funktionellen Geborgenheit im Erythrozyten, im Hämolsat der Wärmeeinwirkung von 49,5° C für zwanzig Minuten ausgesetzt werden. Auch hier werden wieder die Enzymaktivitäten vor und nach Wärmealteration verglichen und der Aktivitätsabfall in Prozent der gemessenen Ausgangsaktivität angegeben. Die Stabilität der Enzyme bei Alte-

Abbildung 5



ration im Hämolysat ist durchweg geringer als bei Alteration im Serum, auch stets geringer als bei Alteration in 0,9% NaCl. Auch hier zeigt sich, daß die oben in der Gruppe mit der größten Stabilität zusammengefaßten und genannten sieben Enzyme einen geschlossenen Block bilden mit etwa gleich großer Stabilität gegenüber Wärmeeinwirkung. Auch die Kinasen verhalten sich etwa gleich in Bezug auf ihre Stabilität. Die Enolase zeigt jedoch einen vollkommenen Aktivitätsverlust. Auch die Glucose-6-P-Dehydrogenase zeigt nur noch eine geringe Restaktivität von $3,3 \pm 1,8$ Prozent Ausgangsaktivität, d.h. die Stabilität der Enolase und der Glucose-6-P-Dehydrogenase ist im Hämolysat gegenüber Wärmeeinwirkung sehr gering.

Die Abbildung 5 gibt die Stabilität der Enzyme nach Alteration im Serum (○), in 0,9% NaCl (△) und im Hämolysat (□) in gemeinsamer Darstellung wieder.

Die Funktionsfähigkeit des glycolytischen Abbauweges ist notwendig für die Bildung von energiereichen Adenosinphosphaten. Die Tabelle 6 (Seite 20) zeigt den ATP-, ADP- und AMP-Gehalt im Vollblut vor und nach Wärmealteration bei 49,5° C für zwanzig Minuten. Erstaunlicherweise hat der Gehalt aller Adenosinphosphate zugenommen. Am stärksten war die Zunahme des ATP-Gehaltes um durchschnittlich $26,8 \pm 1,3\%$ (arithmetischer Mittelwert aus zehn Messungen mit einem signifikanten t-Wert von 68,9 P 0,01). Ebenfalls zugenommen hat der ADP-Gehalt um durchschnittlich $21,1 \pm 1,5\%$ (arithmetischer Mittelwert aus zehn Messungen mit einem signifikanten t-Wert von 46,1 P 0,01). Der AMP-Gehalt hat nur gering zugenommen um durchschnittlich $3,9 \pm 1,5\%$ (arithmetischer Mittelwert aus zehn Messungen mit einem signifikanten t-Wert von 8,5 P 0,01). Aus der Tabelle 6 (Seite 20) geht weiter hervor, daß das Verhältnis ADP zu ATP bei allen Blutsorten nach Wärmealteration abgenommen hat.

Zur Prüfung der Funktionsfähigkeit des Glutathion reduzierenden Systems nach Wärmealteration von 49,5° C für zwanzig Minuten wurden die Erythrozyten mit beta-Acethylphenylhydrazin belastet. Die Ergebnisse dieses Glutathionstabilitätstests (BEUTLER 1957) zeigt Tabelle 7 (Seite 21). Der Vergleich der Glutathionstabilität der einzelnen Blutsorten vor und nach Wärmealteration zeigt keine signifikanten Unterschiede. Das Glutathion reduzierende System ist demnach in wärmealterierten Erythrozyten intakt.

Tabelle 6: ATP-, ADP- und AMP-Bestimmung im Vollblut vor und nach Wärmekubation bei 49,5° C für zwanzig Minuten. Der Gehalt ist angegeben in mg %. In der dritten Spalte ist jeweils angegeben, um wieviel Prozent des ursprünglichen ATP-, ADP- und AMP-Gehaltes dieser nach Wärmeeinwirkung zugenommen hat. In den beiden letzten Spalten ist das Verhältnis ADP zu ATP vor und nach Wärmeealteration angegeben.

	ATP ohne Wärme mg %	ATP mit Wärme mg %	Zu- nahme in %	ADP ohne Wärme mg %	ADP mit Wärme mg %	Zu- nahme in %	AMP ohne Wärme mg %	AMP mit Wärme mg %	Zu- nahme in %	Verhältnis ADP zu ATP in normalem Blut	Verhältnis ADP zu ATP in wärmealter. Blut
Blut 1	16,0	20,2	26	3,0	3,60	20	0,60	0,62	3	1 : 5,35	1 : 5,65
Blut 2	24,6	31,7	29	4,1	5,10	23	1,20	1,23	2	1 : 6,00	1 : 6,25
Blut 3	19,0	24,3	28	3,6	4,40	22	0,90	0,95	6	1 : 5,29	1 : 5,55
Blut 4	13,5	16,9	25	2,9	3,45	19	1,24	1,30	3	1 : 4,65	1 : 4,90
Blut 5	12,5	15,9	27	2,5	3,03	21	0,72	0,75	4	1 : 5,09	1 : 5,21
Blut 6	16,7	21,0	26	3,3	4,02	22	1,10	1,16	6	1 : 5,10	1 : 5,20
Blut 7	16,3	20,8	28	2,8	3,40	21	1,13	1,19	5	1 : 5,85	1 : 6,10
Blut 8	12,7	16,2	26	2,6	3,20	23	1,08	1,12	4	1 : 4,90	1 : 5,05
Blut 9	12,7	16,0	26	2,2	2,60	19	1,08	1,16	2	1 : 5,80	1 : 6,15
Blut 10	17,2	21,8	27	3,0	3,65	21	1,00	1,04	4	1 : 5,70	1 : 6,00

Tabelle 7: Glutathionstabilitätstest nach BEUTLER: Es wird die Stabilität des Glutathion in nicht alterierten und in wärmealterierten Erythrozyten bestimmt. Sie wird angegeben in Prozent Abfall des ursprünglichen Glutathiongehaltes bzw. des dem Glutathiongehalt bei gleicher Erythrozytenzahl entsprechenden Extinktionswertes.

	Extinktion I. ohne Wärme ohne β -Aph	Extinktion II. ohne Wärme mit β -Aph	Abfall mit β - Aph in %	Extinktion III. mit Wärme ohne β -Aph	Extinktion IV. mit Wärme mit β -Aph	Abfall mit β - Aph in %
Blut 1	0,259	0,209	19%	0,251	0,201	20%
Blut 2	0,144	0,137	5%	0,143	0,133	7%
Blut 3	0,172	0,146	15%	0,168	0,144	14%
Blut 4	0,190	0,176	7%	0,184	0,171	7%
Blut 5	0,200	0,178	11%	0,201	0,173	14%
Blut 6	0,185	0,174	6%	0,178	0,169	5%
Blut 7	0,219	0,191	13%	0,220	0,196	11%
Blut 8	0,170	0,133	20%	0,166	0,132	20%
Blut 9	0,235	0,216	8%	0,234	0,210	10%
Blut 10	0,200	0,166	17%	0,197	0,165	16%

DISKUSSION

Der Erörterung der Biochemie des wärmebehandelten Erythrozyten sind zunächst die bekannten morphologischen und biophysikalischen Veränderungen vorangestellt, um ein exaktes Bild über unser Substrat, den wärmealterierten Erythrozyten, zu bekommen.

Die morphologischen Veränderungen, die rote Blutzellen bei Wärmeeinwirkung zeigen, sind von mehreren Untersuchern unter ganz verschiedenen Gesichtspunkten dargestellt worden. Bereits 1865 hat M. Schultze die thermisch bedingten Formveränderungen der Erythrozyten und das Phänomen der Erythrozytenfragmentation genau beschrieben (SCHULTZE 1865). Schubothé und Gross haben den Vorgang der Erythrozytenfragmentation in sehr schönen kinematographischen Untersuchungen verfolgen können (SCHUBOTHE und GROSS 1953). Weiter wurden beschrieben: Im Zusammenhang mit schweren Verbrennungen, wobei eine vermehrte, intravasale Hämolyse mit Hämoglobinämie und Hämoglobinurie beobachtet wurde (HAM et al 1948), bei der Erforschung der Struktur und des Aufbaues der roten Blutzelle und ihrer Membran (JUNG 1942, JUNG 1950, RUHENSTROTH-BAUER 1959), bei der Frage zur Pathogenese des tödlichen Kreislaufkollapses nach Überwärmung einzelner Organe (BRAASCH 1963) und bei der szintigraphischen Darstellung der Milz, ihrer Funktionsprüfung und der Bestimmung ihrer Durchblutung (HARRIS et al 1957, WAGNER et al 1962, FISCHER 1965, FISCHER 1966). Zusammenfassend läßt sich der Vorgang der morphologischen Veränderungen durch Wärmealteration folgendermaßen beschreiben: Wird eine Erythrozytensuspension langsam von 40°C auf 50°C erhitzt, so bemerkt man aufsteigend bis 47°C, mit Ausnahme einer leichten Zunahme des Hämatokrits, keine auffälligen Erscheinungen. Bei weiterer Temperaturerhöhung erscheinen an der Oberfläche der Zellen feine Ausläufer, deren Spitzen sich abrunden. Durch das Zusammenfließen mehrerer Ausläufer entstehen Erythrozyten mit knospenartigen, hämoglobinhaltigen Ausstülpungen, sogenannte "tear-drop-cells" (Abbildung 6).

Dieser Vorgang wird von Jung als Schizozytose bezeichnet. Die Ausstülpungen lösen sich zum Teil ab und liegen frei neben den selbst zum Sphärozyten gewordenen Erythrozyten. Diese künstlich erzeugten Sphärozyten sind nach dem Abkühlen nicht reversibel, wie dies bei osmotisch erzeugten Sphärozyten nach Resuspension in isotoner Lösung der Fall ist (JUNG 1950). Es entstehen durch Wärmealteration bei 49,5°C für zwanzig Minuten zwei Populationen, Sphärozyten und Fragmente. Davon sind etwa 70 bis 80 Prozent Sphärozyten und bis

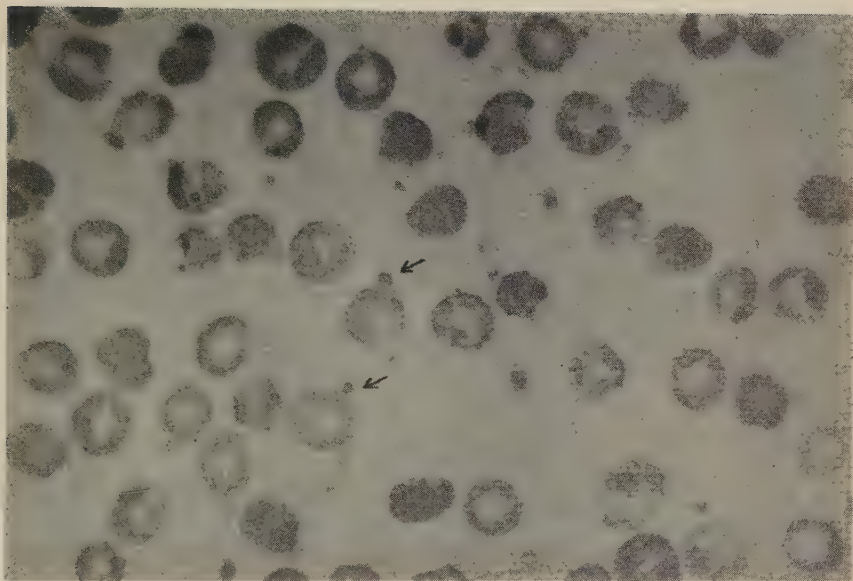


Abbildung 6. Erythrozyten nach Wärmealteration bei $49,5^{\circ}\text{C}$ für zwanzig Minuten, dargestellt in einem nach Pappenheim gefärbten Blutausstrich. Man sieht Erythrozyten, die im Inneren nicht die für den unveränderten Zustand typische, gleichmäßig-konzentrische Verdünnung des bläulich angefärbten Hämoglobins zum Erythrozytenmittelpunkt hin zeigen. Es ist zusammengeballt und unregelmäßig verteilt. Man sieht mehrere Erythrozyten mit knospenartigen Ausstülpungen, sogenannte "tear-drop-cells".

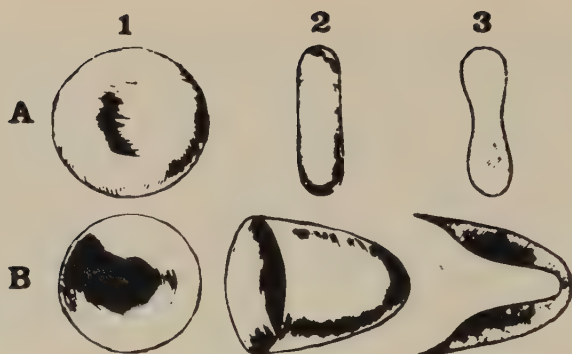


Abbildung 7. Die Form des Erythrozyten in Ruhe (A) und bei Passage der Kapillare (B). Die Zelle gesehen in der Aufsicht, in Richtung der Kapillarströmung (1), die Zelle gesehen von der Seite, senkrecht zur Richtung der Kapillarströmung (2) und im Längsschnitt (3), (GUEST et al 1963).

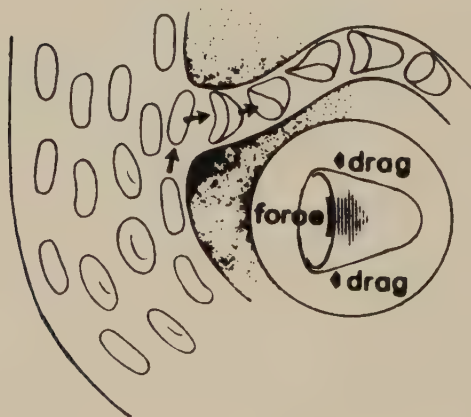


Abbildung 8. Verformung der Erythrozyten bei Eintritt in eine Kapillare. Der in die Abbildung projizierte Kreis zeigt die Kräfte, die während der Passage durch die Kapillaren auf die Zelle einwirken.

30 Prozent Fragmente. Es sollte jedoch hervorgehoben werden, daß dabei nur eine minimale Hämolyse von 1,3 Prozent bei 49,5° C für zehn Minuten stattfindet.

Neben den morphologischen finden sich auch grundlegende, biophysikalische Veränderungen der roten Blutzellen bei Wärmealteration. Es kommt zu einer starken Abnahme der osmotischen und mechanischen Resistenz (HAM et al 1948). Nach Wärmealteration von 49,6° C für zehn Minuten tritt bereits eine 75-prozentige Hämolyse bei einer hypotonen Lösung von 0,51% NaCl auf, während bei Kontrolluntersuchungen von nicht behandeltem Blut eine gleichgroße Hämolyse erst bei 0,33% NaCl-Lösung eintritt. Der Abnahme der osmotischen Resistenz geht grob parallel eine Abnahme der mechanischen Resistenz der Erythrozyten bei Schütteln des Blutes mit Glasperlen unter definierten Bedingungen. Bei Wärmealteration verliert die Zelle eine weitere biophysikalische Eigenschaft der roten Blutkörperchen, die Plastizität (TEITEL 1965). Darunter versteht man die Fähigkeit zur reversiblen Verformung, die normale Erythrozyten befähigt, durch Öffnungen zu gelangen, deren Durchmesser kleiner ist als ihr eigener. Sie ist von grundlegender funktioneller Bedeutung für das Verhalten der Zelle in der terminalen Strombahn, den Kapillaren, und an ihrer engsten Stelle, dem perisinusalen, retikulären Maschenwerk der Milz. Bei Durchtritt durch die Kapillaren ändert der Erythrozyt seine Form von einer bikonkaven Scheibe in einen Doppelparaboloid mit einem glockenartigen Zentrum (GUEST et al 1963). Aus dieser Arbeit stammen Abbildung 7 und Abbildung 8.

In der Milz ermöglicht diese Plastizität den Zellen die Passage des feinporigen Maschenwerkes. Durch den Verlust der Plastizität ist der Erythrozyt zu keiner nennenswerten Verformung mehr befähigt. Er bleibt deshalb im Maschenwerk der Milz hängen und wird sequestriert. Dies ist die Grundlage für die oben beschriebenen Verfahren der Milzuntersuchung.

Unsere Fragestellung ist nun, ob diesen massiven morphologischen und biophysikalischen Veränderungen solche im Stoffwechsel des Erythrozyten zugrunde liegen, wie sie etwa beim physiologischen Altern der Erythrozyten und bei gewissen hämolytischen Anämien vorliegen. Um diese Frage zu beantworten, müssen wir zunächst auf den Stoffwechsel des Erythrozyten eingehen.

Bei der Reifung aus dem Erythroblasten verlieren die Erythrozyten die Zellorganellen des Kerns, der Mitochondrien und der Mikrosomen und damit die Fähigkeit zur Synthese von DNA, RNA, Proteinen, Lipiden und Porphyrin (LONDON et al 1950, LONDON 1961, KRUH und BORSOOK 1956, LONDON

und SCHWARZ 1953). Auch im Kohlenhydratstoffwechsel fehlen dem reifen Erythrozyten die Enzymketten des Trikarbonsäurezyklus und der Atmungskette mit Ausnahme von Restaktivitäten der Isozitat-Dehydrogenase, Fumarase und Malat-Dehydrogenase (RAPOPORT 1947, BARTLETT et al 1953, LÖHR 1965). Die enzymatische Ausstattung der Erythrozyten ist also im Vergleich zu ihren kernhaltigen Vorstufen sehr einfach. Sie besitzen lediglich noch die zytoplasmatischen Enzymketten der Glycolyse und des Pentosemonophosphat-shunts und die strukturegebundenen ATP- und DPN-spaltenden Enzyme, ATPase und DPNase. Diese Verhältnisse werden eindrucksvoll durch ein Schema von Löhr über die biochemischen Vorgänge bei der Reifung des kernhaltigen Erythroblasten zum kernlosen Erythrozyten in Abbildung 9 verdeutlicht. Die noch vorhandenen Enzymketten des Kohlenhydratstoffwechsels garantieren u.a. eine genügende Bereitstellung energiereicher Phosphate zur Aufrechterhaltung der bikonkaven Scheibenform (NAKAO et al 1960 und NAKAO et al 1961).

Jahrmärker und Hörmann berichteten 1967 auf dem "Internationalen Internistenkongress in Wiesbaden" über Untersuchungen zur Hitzeschädigung des Erythrozyten. Diese Autoren fanden, daß ab 51° C und mit Höhe und Dauer der Hitzeeinwirkung zunehmend osmotische und Spontanhämolysen stärker werden, eine Verformung und Fragmentation der Erythrozyten auftreten, es zum cellulären Kaliumverlust und zur Natriumaufnahme kommt, die Glycolyse herabgesetzt wird und daß die Dephosphorylierung überwiegt. ATP-Gehalt und ATP/ADP-Quotient sollen bereits ab 49° abzunehmen beginnen. Dies konnten wir allerdings für die Temperatur von 49,5° C für zwanzig Minuten noch nicht, sondern erst bei etwas höheren Temperaturen nachweisen. Die genannten Autoren berichteten weiter über eine Zunahme der stationären Konzentrationen von Fructosediphosphat und Dihydroxyacetonphosphat im Bereich von 51-54° C. Bei 59° C sind die Zellfunktionen völlig gestört und es kommt zum Zelluntergang. Die Veränderungen sind auch bei Inkubation unter physiologischen Bedingungen nicht reversibel (JAHRMÄRKER und HÖRMANN 1967).

Die Ergebnisse unserer Enzymbestimmungen zeigen deutlich, daß ein nennenswerter Enzymverlust nach Wärmealteration nur bei der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, ein geringer Verlust bei der Enolase und ein noch geringerer Verlust bei der Hexokinase eintreten. Die anderen Enzyme fallen nur minimal ab. Damit bestätigt sich zum Teil der Befund von WAGNER et al 1962. Diese Untersucher bestimmten aber nur die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und sprachen aufgrund des gefundenen Aktivitätsabfalls und der Tatsache, daß wärmealterierte Erythrozyten ebenso wie physiologisch gealterte Erythrozyten hauptsächlich in der Milz abgefangen werden, von einer, der normalen Zell-

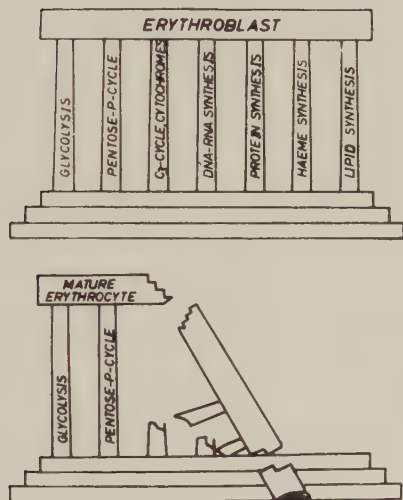


Abbildung 9. Biochemische Vorgänge bei der Reifung des kernhaltigen Erythroblasten zum kernlosen Erythrozyten. Die reifen roten Blutzellen besitzen nicht mehr die Enzymketten des Tricarbonsäure- (C_3)-Zyklus, des Glycerin-1-Phosphatzyklus, der Atmungskette (Cytochrome) sowie die Fähigkeit zur Synthese von DNA, RNA, Proteinen, Haem, und Lipiden. Sie decken ihren Energiebedarf aus der Glycolyse und dem Pentose-Phosphat-Cyklus. (LÖHR 1965).

alterung in gewisser Weise entsprechender Stoffwechselveränderung. Dieser Vergleich ist jedoch nach den Arbeiten von Löhr und Waller über die in vivo-Alterung der Erythrozyten nicht mehr haltbar (LÖHR und WALLER 1962). Diese berichten, daß bei der Alterung neben der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase noch die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase einen exponentiellen Abfall ihrer Enzymaktivitäten zeigen. Der Engpaß im Stoffwechsel der Erythrozyten bei der Alterung liegt aber bei der Hexokinase-reaktion. Die Hexokinase ist und bleibt auch während der Erythrozytenalterung das begrenzende Enzym des Kohlenhydratstoffwechsels (GRIGNANI und LÖHR 1960, LÖHR und SCHABERT 1962). Bei einem geringen Abfall der Hexokinaseaktivität haben wir, da das Enzym sowohl Engpaß der Glycolyse wie auch des Pentosemonophosphatshunts ist, Auswirkungen auf diese beiden Stoffwechselwege zu erwarten. In der Tat kommt es beim alternden Erythrozyten zu einem Abfall des ATP zu Gunsten des ADP, d.h. das Verhältnis ATP zu ADP von 5 zu 1 verschiebt sich am zweiundneunzigsten Tag der Erythrozytenalterung auf etwa 1 zu 1 (LÖHR et al 1958, LÖHR und WALLER 1962). Daneben kommt es zu einem Abfall des reduzierten Glutathion. Ein verminderter ATP-Spiegel, ein erhöhter ADP-Spiegel und ein verminderter Gehalt an Glutathion führen zu einer weiteren funktionellen Hemmung der Hexokinase-reaktion. So entwickelt sich ein Circulus vitiosus, der schließlich zum Zelltod an ATP-Mangel und damit über ein Sphärozytenstadium zur osmotischen Hämolyse führt. Im Gegensatz dazu liegt bei wärmealterierten Erythrozyten nur ein Mangel an Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase vor. Der ATP-Gehalt der Zellen nimmt nicht ab, er nimmt sogar durchschnittlich um $26,8 \pm 1,3\%$ des Ausgangswertes zu. Dabei erhöht sich der ADP-Gehalt ebenfalls auf $21,1 \pm 1,5\%$, während der AMP-Gehalt seinen Wert etwa beibehält und nur gering um $3,9 \pm 1,5\%$ ansteigt. Eine mögliche Erklärung für die Zunahme der Gesamtadenosinphosphatfraktion könnte einmal in einer vermehrten Bildung aus Adenin und Ribose-5-Phosphat während der Wärmeinkubation sein. Es ist bekannt, daß der Erythrozyt aus Adenin und Glucose über bestimmte enzymatische Reaktionen Adenin-Triphosphat synthetisieren kann (NAKAO et al 1960, NAKAO et al 1961, JOSHIKAWA und NAKAO 1962). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, daß durch Wärmeverbehandlung die Erythrozytensuspension besser aufgeschlossen und nach der Eiweißfällung durch die Perchlorsäure mehr ATP, ADP und AMP aus dem Niederschlag herausgelöst wird. Diese Zunahme wäre dann rein methodisch bedingt und nicht durch eine reelle Zunahme verursacht. Für diese Erklärung spricht die Tatsache, daß der ATP- und ADP-Gehalt in gleicher Größenordnung zugenommen haben, was bei voraussichtlich gleicher Lagerung im Erythrozyten zu erwarten ist. In unserem

Zusammenhang ist aber wichtig, daß der ATP-Gehalt des Erythrozyten nicht abfällt und das Verhältnis ATP zu AMP sogar noch zu Gunsten von ATP zugenommen hat (siehe Tabelle 6, Seite 20). Der nicht verminderte ATP/AMP-Quotient der wärmealterierten Erythrozyten und der von WAGNER 1962 berichtete nur unwesentliche Abfall des reduzierten Glutathion - von einem Gehalt von 71 ± 4 mg/100 ml Blutkörperchen vor der Wärmeeinwirkung auf 69 ± 8 mg/100 Blutkörperchen nach sechzig Minuten Erwärmen auf 50°C - spricht gegen die Annahme eines der normalen Alterung entsprechenden Prozesses durch die Wärmealteration. Es wäre noch die Möglichkeit einer Hexokinaseinaktivierung durch pH-Verschiebung bei Wärmealteration zu diskutieren. Die Hexokinase besitzt ihr Wirkungsoptimum bei einem pH = 8,2. Sie erleidet unterhalb des physiologischen pH von 7,4 einen starken Aktivitätsverlust (BOCK et al 1962). Diese wird von den Autoren als Erklärung von renalen Anämien herangezogen. Nach den Untersuchungen mit der Glaselektrode tritt bei Wärmealteration von Erythrozyten im Serum keine pH-Veränderung auf, und damit ist eine Hemmung der Hexokinase auf diesem Weg auszuschließen (HAM et al. 1948).

Noch am besten könnte man den isolierten Abfall der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase mit der hereditären, enzymopenischen, hämolytischen Anämie mit Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel vergleichen. Bei diesem Krankheitsbild dürfte es sich um die am häufigsten vorkommende Erbkrankheit mit schätzungsweise 100 Millionen Merkmalsträgern handeln (CARSON 1960, LÖHR und WALLER 1963). Waller, Löhr und Tabatabai wiesen erstmals quantitativ das völlige Fehlen dieses Enzyms in Erythrozyten von Iranern und Italienern nach (WALLER, LÖHR und TABATABAI 1957). Das Fehlen dieses Enzyms führt zu einer Erniedrigung des Gehaltes an reduziertem Glutathion und bei Belastung des Erythrozyten mit oxydierenden Substanzen wie Primaquin, Anilinderivaten und Acetylphenylhydrazin zu einem weiteren Abfall dieses für die Zellintegrität wichtigen Stoffes (ALVING 1948, FLANAGAN et al. 1953, BEUTLER 1956). Reduziertes Glutathion hat im Erythrozyten unter anderem die wichtige Aufgabe, die Sulfhydrylgruppen zahlreicher Dehydrogenasen, Kinasen, Phosphatasen und von Strukturproteinen vor Oxydation zu schützen (SCHEUCH und RAPOPORT 1962, LÖHR und WALLER 1961, LÖHR und WALLER 1962, LÖHR et al. 1963). Wie Wagner berichtet, haben wir keinen Abfall des reduzierten Glutathion nach Wärmealteration (WAGNER et al 1962). Es ist aber bekannt, daß bei Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel der Glutathion-Gehalt normal sein kann und daß es nur unter Belastung des Glutathion-reduzierenden Systems mit den oben erwähnten Stoffen zu einer hämolytischen Krise mit starkem Abfall des reduzierten Glutathion kommt. Deshalb wurde der Glutathionstabilitätstest, der eine wesentlich bessere Aussage über

die Leistungsfähigkeit dieses Systems anzeigt, durchgeführt. Dieser Test wurde 1956 von Beutler als Suchtest für die oben beschriebene Anämieform angegeben (BEUTLER 1956). Es zeigte sich, daß trotz des Aktivitätsabfalls der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase auf $28,2 \pm 1,1$ Prozent des Ausgangswertes die Glutathionstabilität sich nicht signifikant nach Wärmealteration ändert. Dies wird auch durch die Tatsache bestätigt, daß bei der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel-Anämie nur homozygote Merkmalsträger mit einem fast vollkommenen Mangel an diesem Enzym klinisch nach Einnahme gewisser Medikamente erkranken, während heterozygote Merkmalsträger mit teilweiseem Aktivitätsverlust von 20 bis 80 Prozent des normalen Enzymgehaltes klinisch gesund bleiben. Bezogen auf die Normalwerte der Hexokinase von $1,7 \pm 0,3$ IU und für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase von $17,1 \pm 2,3$ IU würde eine Aktivitätsabnahme auf $28,2 \pm 1,1$ Prozent nach Wärmealteration immer noch eine Restaktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase von 4,8 IU bedeuten. Mit anderen Worten, die Restaktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase ist immer noch beinahe dreimal größer als die Hexokinaseaktivität. Berücksichtigt man weiter die Befunde von Murphy, daß nur ein Zehntel des durch die Hexokinasereaktion eingeschleusten Glucose-6-Phosphat über den Pentosemonophosphatshunt metabolisiert wird, während neun Zehntel für die Glycolyse verbraucht werden (MURPHY 1960), so wird noch viel deutlicher, in welchem Überschuß die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase im Vergleich zur Hexokinase angelegt ist. Der beobachtete Aktivitätsabfall kann also auf den Energiestoffwechsel keine wesentlichen Auswirkungen haben. Ein zweiter Beweis für diese Feststellung wird auch durch weitere Versuche von Murphy über den Anteil der beiden Stoffwechselwege, der Glycolyse und des Pentosemonophosphatshunts mit radioaktiv markierter Glucose beim Erhitzen von Blut auf $49,5^{\circ}\text{C}$ für zwei Stunden erbracht (MURPHY 1960). Er berichtet, daß die Durchflußrate für Glucose bei 37°C während zwei Stunden für beide Stoffwechselwege zusammen $1,30 \mu\text{g}/\text{min}/\text{ml}$ Blut mit Hämatokrit 50 Prozent und für den Pentosemonophosphatshunt $0,20 \mu\text{g}/\text{min}/\text{ml}$ Blut mit Hämatokrit 50 Prozent beträgt. Bei $49,0^{\circ}\text{C}$ dagegen beträgt die Gesamtdurchflußrate $3,07 \mu\text{g}/\text{min}/\text{ml}$ Blut, während sie im Pentosemonophosphatzycus $0,44 \mu\text{g}/\text{min}/\text{ml}$ Blut beträgt. Diese Ergebnisse zeigen sehr deutlich, daß keine Verminderung der Durchflußrate des Pentosemonophosphatshunts vorliegt. Dieser Stoffwechselweg gehorcht im Gegenteil noch der Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel und steigert seine Leistung entsprechend der Temperaturerhöhung.

Vor der Besprechung des Aktivitätsverlustes der anderen Enzyme sei noch auf die Temperaturabhängigkeit der Inaktivierung der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase eingegangen (siehe Tabelle 3, Seite 16, und Abbildung 4).

Schon bei einer Temperatur von $41,5^{\circ}\text{C}$ beobachteten wir eine Aktivitätsabnahme der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase von $4,9 \pm 0,8$ Prozent. Diese Temperatur entspricht in vivo einem maximalen Fieberzustand. Der Verlauf der Kurve ist aber ebenfalls ein weiterer Hinweis, daß der Abfall der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase nicht für die beobachteten morphologischen und biophysikalischen Veränderungen verantwortlich ist. Denn diese treten erst oberhalb einer Schwelle von 47°C in Erscheinung, während der Verlauf des Aktivitätsverlustes einen gleichmäßigen fast linearen Abfall von $43,5^{\circ}\text{C}$ bis $49,5^{\circ}\text{C}$ ohne merkbare Veränderung des Kurvenverlaufes bei 47°C zeigt.

Betrachten wir uns den Aktivitätsverlust der anderen gemessenen Enzyme nach Wärmeeinwirkung und errechnen anhand der von Löhr und Waller angegebenen Normalwerte für intraerythrozytäre Enzyme ihre internationalen Einheiten (IU), so gilt auch hier dasselbe wie bei der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, natürlich in noch stärkerem Ausmaß. Die Enzyme sind im Vergleich zur Hexokinaseaktivität in geradezu verschwenderischer Weise in der Zelle vorhanden. Ein Aktivitätsabfall der Enolase um $17,8 \pm 1,1$ Prozent der Ausgangsaktivität und ein noch geringerer Abfall bei den anderen Enzymen wirkt sich in keiner Weise auf die Stoffwechselleistung des Erythrozyten aus. Dagegen ist der geringe Hexokinaseabfall von $6,6 \pm 0,8$ Prozent der Ausgangsaktivität schon bedeutungsvoller, wenn zusätzlich noch eine funktionelle Hemmung des Enzyms vorhanden wäre. Dies ist aber nach den oben angeführten Erläuterungen nicht der Fall. Es liegt weder eine Hemmung durch ATP-Abfall, ADP-Anstieg, Abfall des Glutathion, noch eine Abnahme des pH vor.

Es soll nun auf einige interessante Nebenfunde eingegangen werden, die etwas abseits von unserer eigentlichen Fragestellung stehen und deshalb nur kurz beschrieben und erklärt werden sollen. Die Stabilität eines Enzyms bei Wärmeeinwirkung ist keine Konstante, die nur von der Temperatur und ihrer Einwirkungsdauer abhängt, sondern sie wird auch sehr wesentlich mitbestimmt durch das Milieu, in dem sich das Enzym, bzw. sein Träger, der Erythrozyt, befindet. Wie aus der Tabelle 4, Seite 17, ersichtlich, ist die Stabilität aller Enzyme bei Wärmebehandlung der Erythrozyten in 0,9% NaCl durchweg geringer als bei gleicher Behandlung im Serum. Besonders die Hexokinase zeigt einen um 17,5 Prozent, die Enolase einen um 11,5 Prozent, die Pyruvatkinase einen um 4,8 Prozent, die Glycerat-1-Kinase einen um 3,8 Prozent, die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase einen um 2,9 Prozent, die Aldolase einen um 2,6 Prozent höheren Aktivitätsabfall, als bei Alteration im Serum. Bei den anderen Enzymen war der Unterschied nur geringfügig, aber doch vor-

handen. Eine Erklärung für dieses unterschiedliche Verhalten bei Alteration im Serum und in 0,9% NaCl liegt in der Tatsache, daß die Durchflußraten des Kohlenhydratstoffwechsels bei Alteration in 0,9% NaCl aus zwei Gründen stark abfallen. Dem Erythrozyten fehlt in 0,9% NaCl das Substrat seines Stoffwechsels, die Glucose, die er mangels nennenswerter Glycogenvorräte aus dem Außenmedium aufnehmen muß. Außerdem ist sein Stoffwechsel durch die starke funktionelle Hemmung bei dem neutralen pH der NaCl-Lösung fast stillgelegt, denn die Hexokinasereaktion zeigt bei einem neutralen pH eine mehr als 80-prozentige Aktivitätsminderung (LÖHR 1965). Eine Verminderung der Durchflußraten bedeutet aber, daß die Enzyme nicht in optimaler Substratsättigung vorliegen. Damit nimmt ihre Stabilität gegenüber verschiedenen Noxen, wie z.B. Wärme, ab (LÖHR und WALLER 1962). Durch die Hemmung des Stoffwechsels kommt es sicher auch zu einem Abfall des reduzierten Glutathion und damit zur Verminderung des Schutzes, besonders der SH-Enzyme, wie der Kinasen und anderer Enzyme. Außer diesen vom Stoffwechsel abhängigen Stabilitätsfaktoren eines Enzyms spielt sicher auch die Tatsache eine Rolle, daß eine pH-Verschiebung zum sauren Bereich bei den meisten Enzymeiweißen eine Verschiebung in Richtung zum isoelektrischen Punkt dieser Stoffe bedeutet. An diesem Punkt ist die Neigung zu einer Denaturierung am größten.

Einen noch weiteren Verlust ihrer Stabilität zeigen alle Enzyme, wenn sie - herausgelöst aus ihrer geschützten Lage im Erythrozytenstroma - im Hämolytat der Wärme ausgesetzt werden. Besonders betroffen sind wieder die Kinasen (Hexokinase, 3-Phosphat-Glycerat-1-Kinase- und Pyruvatkinase) und die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase sowie die Enolase. Die Enzyme stehen nun nicht mehr in der engen örtlichen und funktionellen Beziehung zu den Nachbargliedern der Enzymkette, von denen sie das Substrat übernehmen und entsprechend verändert wieder abgeben. Sie liegen auch hier nicht in Form einer optimalen Substratsättigung vor. Hinzu kommt noch, daß auch die Enzym-coenzym-Bindung, welche in der intakten Zelle gewährleistet ist und für die Stabilität des Enzyms ebenso wichtig ist, wie die Enzym-Substrat-Bindung, nicht mehr vorhanden ist (WALLER und LÖHR 1962). Weiter spielt hier, in noch stärkerem Maße als bei der Alteration in 0,9% NaCl, die Verminderung des reduzierten Glutathion und damit der Wegfall des Schutzes der SH-Enzyme eine Rolle. In der ersten Zusammenfassung läßt sich mit Bestimmtheit sagen, daß der Aktivitätsverlust der gemessenen Enzyme bei Wärmealteration der Erythrozyten im Serum die Leistungsfähigkeit ihres Kohlenhydratstoffwechsels nicht beeinträchtigt und damit auch nicht für die an den Anfang der Diskussion gestellten morphologischen und biophysikalischen Veränderungen verantwortlich zu machen ist.

Es erhebt sich nun die Frage, welche anderen Ursachen möglicherweise für die beschriebenen Veränderungen des Erythrozyten in Erwägung zu ziehen sind und einen Hinweis für spätere Untersuchungen ergeben könnten. Das von einem intakten Energiestoffwechsel gelieferte ATP - in wärmealterierten Erythrozyten ausreichend vorhanden - ist die energische Voraussetzung für ein in der Erythrozytenmembran lokalisiertes, für die Zelle unentbehrliches Kationentransportsystem. Dieses ermöglicht es dem Erythrozyten, intrazellulär einen hohen Kalium- und einen niedrigen Natrium-Spiegel gegen erhebliche Konzentrationsunterschiede im Blutplasma aufrecht zu erhalten. Durch die neuen Erkenntnisse, daß die Erythrozytenmembran für Kationen teilweise durchlässig ist (PASSOW 1961), hat dieses Transportsystem für die Form und den Bestand der Zelle noch eine weitere wichtige Bedeutung. Es schützt sie vor der immer drohenden osmotischen Hämolyse. Die intrazelluläre Kationenkonzentration nämlich strebt, dem hohen Gehalt an nicht-permeablen Hämoglobinanionen in der Zelle entsprechend, einem von Donnan angegebenen viel höherem Wert zu, als in den Erythrozyten tatsächlich vorliegt. Bei Einstellung des Donnan-Gleichgewichtes würde der Erythrozyt aber auch vermehrt Wasser aufnehmen und damit der osmotischen Hämolyse anheimfallen. Das Kationen-Transportsystem besteht aus einem ATP-spaltenden, in der Erythrozytenmembran vorhandenem Enzymsystem, das entweder selbst oder über Phosphatidsäuren den Transport der Ionen übernimmt (SKOU 1965). Wie der Transport im einzelnen aber vor sich geht und wie viele Zwischenglieder und Faktoren dabei eine Rolle spielen, ist noch Gegenstand lebhafter Diskussionen (PASSOW 1961, HOFMANN 1966). Es ist allerdings noch zu früh, um Aussagen zu machen, ob und in welchem Umfang bei der Wärmealteration dieses Transportsystem geschädigt wird. Die Folge einer Schädigung wäre, daß die durch Wärme erzeugten Sphärozyten "osmotische" Sphärozyten wären. Dagegen sprechen aber die Befunde von Jung, der aufschlußreiche Untersuchungen an den Blutschatten machte (JUNG 1950). Er konnte nachweisen, daß die Eigenschaften des roten Blutkörperchens, welche ihm die besondere Form einer bikonkaven Scheibe verleihen, in der Erythrozytenmembran lokalisiert sein müssen. Er zeigte, daß durch vorsichtige Hämolyse von osmotisch erzeugten Sphärozyten die Blutschatten ihre bikonkave Scheibenform wieder annehmen. Die Sphärozytose ist also hierbei nur durch die Schwellung hervorgerufen und nicht durch eine Schädigung der Zellmembran. Nach vorsichtiger Hämolyse von durch Hitze erzeugten Sphärozyten entstehen aber Schatten, die die bikonkave Scheibenform nicht mehr aufweisen. Dies spricht gegen die Annahme, daß Wärmesphärozyten in gewisser Hinsicht doch "osmotische" Sphärozyten sind, wie dies bei Schädigung des Transportsystems der Fall wäre. Es ist nach den Befunden von Jung zu vermu-

ten, daß gewisse Membranstrukturen und Membranbestandteile durch die Wärmealteration so verändert werden, daß es zu einer nichtosmotischen, irreversiblen Sphärozytose kommt.

Als solche Bestandteile der Erythrozytenmembran wären gewisse Proteine, Lipoproteine und Glycoproteine in Erwägung zu ziehen. Desgleichen haben die Membranlipide, wie Phospholipide, freies Cholesterin und Glycolipide einen nicht unerheblichen Einfluß auf die besondere Struktur und Form der Erythrozytenmembran (WEED und REED 1966). Der Verlust von Membranlipiden ereignet sich bei der Entstehung der Wärmesphärozyten im Stadium der "tear-drop-cells" (WAGNER et al 1962, WEED und REED 1965). Die Erforschung der Erythrozytenmembran und die Bedeutung ihrer einzelnen Bestandteile ist heute noch weitgehend im Gange. Man hat einige Membranmodelle entwickelt, in welcher Weise die einzelnen Membranbausteine, Lipide, Eiweiße und Glycoproteide in der Membran angeordnet sind (WEED und REED 1966). Alle diese Modelle geben aber noch keine befriedigende Erklärung für die Aufrechterhaltung der bikonkaven Scheibenform der Erythrozyten. Es ist deshalb bis jetzt nicht möglich, eine Aussage zu machen, inwieweit die Wärmeeinwirkung über Veränderungen der Membran zu der wärmeinduzierten Sphärozytose beiträgt. Zur Beantwortung der eingangs vorgelegten Frage ist jedoch eine nachhaltige Stoffwechselstörung, die zum Zelluntergang führt, durch Wärmebehandlung unwahrscheinlich.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Bei der Szintigraphie der Milz, bei der Bestimmung ihrer Durchblutung und bei ihrer Funktionsprüfung hat sich der wärmealterierte Erythrozyt als besonders geeigneter Träger der Radioaktivität erwiesen. Er zeigt aufgrund bestimmter morphologischer und biophysikalischer Veränderungen gegenüber dem normalen Erythrozyten eine besonders große Affinität zur Milz.
2. In der Hoffnung, ein biochemisches Korrelat dieser Veränderungen zu finden, bestimmten wir eine Reihe von Enzymen des Erythrozytenstoffwechsels, die Adenosinphosphate und die Glutathionstabilität nach Wärmealteration der Erythrozyten.
3. Wir fanden einen hohen Aktivitätsverlust der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, einen geringeren bei der Enolase und Hexokinase und nur einen minimalen bei den anderen Enzymen. Die Adenosinphosphate zeigten keinen Abfall, und es war auch kein Verlust der Glutathionstabilität nachzuweisen. Der Stoffwechsel des Erythrozyten ist nach der Wärmealteration aber noch weitgehend intakt, soweit er die untersuchten Stoffwechselgrößen betrifft. Der gefundene Aktivitätsverlust einiger Enzyme beeinträchtigt den Erythrozytenstoffwechsel nur unbedeutend, denn die meisten Enzyme sind im Erythrozyten in großem Überschuß vorhanden und die nach Wärmealteration noch erhaltene Restaktivität ist immer noch um vieles größer als die Aktivität der den Stoffwechsel des Erythrozyten begrenzenden Hexokinase, die nur eine minimale Abnahme ihrer Aktivität zeigt.
4. Die Aktivitätsverluste der Enzyme sind also nicht für die morphologischen und biophysikalischen Veränderungen der wärmealterierten Erythrozyten verantwortlich zu machen. Wir konnten durch Gegenüberstellung der biochemischen Befunde mit Arbeiten von Löhr und Waller zeigen, daß der wärmealterierte Erythrozyt nicht mit dem physiologisch gealterten Erythrozyten und auch nicht mit dem Erythrozyten bei Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel-Anämie vergleichbar ist.
5. Der wärmealterierte Erythrozyt ist eine neuartige, künstlich veränderte Zelle, die kein Korrelat unter physiologischen und pathologischen Bedingungen besitzt, die aber die besondere Eigenschaft aufweist, sehr schnell in der Milz abgelagert zu werden. Möglicherweise liegt der Angriffspunkt der Wärme in spezifischen, für die Form des Erythrozyten verantwortlichen Membranbestandteilen, die durch Wärme verändert werden.

LITERATURNACHWEIS

- ADAM, H.: Inaug.-Diss., Marburg (1955).
- ALVING, A.S.: Pentaquine and Isopentaquine, therapeutic agents in reducing relapse rate in vivax malaria. Proc. 4th Intern. Congr. on tropical Med. and Malaria (Washington 1948), 10-18.
- BARTLETT, G.R. und MARLOW, A.A.: Erythrocyte carbohydrate metabolism I. J. Lab. clin. Med. 42 (1953), 188-198.
- BEUTLER, E.: Invitro studies of the stability of red cell glutathione, a new test for drug sensitivity. J. clin. Invest. 35 (1956), 690-691.
- BEUTLER, E.: The glutathione instability of drug-sensitive red cells. An new methode for the in vitro detection of drug sensitivity. J. Lab. clin. Med. 49 (1957), 84-95.
- BOCK, H.E., KARGES, O., LÖHR, G.W. und WALLER, H.D.: Besonderheiten im Fermentgehalt von Megalozyten. Klin. Wschr. 36 (1958), 56-60.
- BOCK, H.E., LÖHR, G.W. und WALLER, H.D.: Beitrag zur Pathogenese renaler Anämien. Schweiz. med. Wschr. 92 (1962), 1213-1219.
- BRAASCH, D.: Verminderte Erythrozytenflexibilität (hervorgerufen durch Barbiturate, Verbrennungen, Hypoxämien) und ihre Wirkung auf den Capillarkreislauf. Pflügers Archiv 278 (1963), 130-140.
- CARSON, P.E.: Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase deficiency in hemolytic anemia. Fed. Proc. 19 (1960), 995-1006.
- DELBRÜCK, A., ZEBE, E. und BÜCHER, T.: Über Verteilungsmuster von Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels im Flugmuskel, Sprungmuskel und Fettkörper von Locusta migratoria und ihre cytologische Zuordnung. Biochem. Z. 331 (1959), 273-296.
- FLANAGAN, C.L., BEUTLER, E., DERN, R.J. und ALVING, A.S.: Biochemical changes in erythrocytes during hemolysis induced by aniline derivatives. J. Lab. clin. Med. 46 (1953), 814-815.
- FISCHER, J.: Die Milzszintigraphie. Der Radiologe 10 (1965), 372-381.

- FISCHER, J. und WOLF, R.: Durchblutung und Funktion der Milz. VII. Internationales Symposium, Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung, Bad Gastein, 10.-13.1.1966.
- FISCHER, J. und WOLF, R.: Die quantitative Abschätzung der Milzgröße mit Hilfe der Szintigraphie. Dtsch.med.Wschr. 88 (1963), 1430-1437.
- GRIGNANI, F. und LÖHR, G.W.: Über die Hexokinase in menschlichen Blutzellen. Klin.Wschr. 38 (1960), 796-799.
- HAM, H.T., SHEN, S.S., FLEMING, E.M., CASTLE, W.B.: Studies on the destruction of red blood cells IV. Blood 3 (1948), 373-403.
- HARRIS, J.M., Mc ALLESTER, J.M. und PRANKERD, T.A.J.: The relationship of abnormal red cells to the normal spleen. Clin.Sci. 16 (1957), 223-230.
- HOFMANN, J.F.: The red cell membrane and the transport of sodium and potassium. Am.J.Med. (1966), 666-680.
- HORECKER, B.L. und SMYRNIOTIS, P.Z.: Phosphogluconic and Dehydrogenase from Yeast. J.biol.chem. 193 (1951), 371-381.
- JAHRMÄRKER, H. und HÖRMANN, M.: Untersuchungen zur Hitzeschädigung des Erythrozyten. Tagungsprotokoll des "Internationalen Internistenkongresses in Wiesbaden" (1967), 60-61.
- JOHNSON, Ph.M., HERION, J.C. und MOORING, S.L.: Scintillation scanning of the normal human spleen utilizing sensitized radioactive erythrocytes. Radiology 74 (1960), 99-110.
- JUNG, F.: Strukturprobleme am roten Blutkörperchen. Die Naturwissenschaft 37 (1950), 229-233 und 254-260.
- JUNG, F.: Zur Pathologie der roten Blutkörperchen. Klin.Wschr. 42 (1942), 917-922.
- KRONBERG, A. und HORECKER, B.L.: Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Colowick, S.P. und Kaplan, N.O. (eds.): Methode in Enzymology, Vol.I, Academie Press, New York.
- KRUH, J. und BORSOOK, H.: Hemoglobin synthesis in rabbit reticulocytes in vitro. J.biol.Chem. 220 (1956), 905-915.
- KUBOWITZ, F. und OTT, P.: Isolierung und Kristallisation eines Gärungsfermentes aus Tumoren. Biochem.Z. 314 (1943), 94-100.
- LÖHR, G.W.: Glucosestoffwechsel der roten Blutzellen. Series Haematologica 10 (1965), 1-22.

- LÖHR, G.W., BAUM, P. und KAMM, G.: Toxische hämolytische Anämien. Med.klin. 58 (1963), 2110-2120.
- LÖHR, G.W. und SCHABERT, H.: Enzymbestimmungen an alternden Blutzellen und experimentelle Untersuchungen zur Frage der Leukocytenkonservierung. Inauguraldissertation Schabert, N., Marburg (1962).
- LÖHR, G.W. und WALLER, H.D.: Zur Biochemie der Erythrozytenalterung. Folia haemat. (Lpz.) 78 (1962), 385-402.
- LÖHR, G.W. und WALLER, H.D.: Zur Biochemie einiger angeborener hämolytischer Anämien. Folia Haemat. (N.F.) 8 (1962), 377-397.
- LÖHR, G.W. und WALLER, H.D.: Biochemie und Pathogenese der enzymopenischen hämolytischen Anämien. Dtsch.med.Wschr. 86 (1961), 27-29 und 87-93.
- LÖHR, G.W. und WALLER, H.D.: Biochemie und Pathogenese erblicher hämolytischer Anämien mit Enzymdefekten im Hexosemonophosphatzyklus. Nova Acta Leopoldina N.F. 26 (1963), 143-162.
- LÖHR, G.W. und WALLER, H.D.: Eine neue enzymopenische hämolytische Anämie mit Glutathionreduktase-Mangel. Med.Klin. 57 (1962), 1521-1525.
- LÖHR, G.W., WALLER, H.D. und KARGES, O.: Quantitative Fermentbestimmungen in roten Blutzellen. Klin.Wschr. 35 (1957), 871-875.
- LÖHR, G.W., WALLER, H.D., KARGES, O., SCHLEGEL, B. und MÜLLER, A.A.: Zur Biochemie der Alterung menschlicher Erythrozyten. Klin.Wschr. 36 (1958), 1008-1013.
- LONDON, J.M.: The metabolism of erythrocyte. Harvey Lecture, Academic Press, New York (1961).
- LONDON, J.M. und SCHWARTZ, H.: Erythrocyte metabolism. The metabolic behaviour of the cholesterol of human erythrocytes. J.clin.Invest. 32 (1953), 1248-1252.
- LONDON, J.M., SHEMIN, D. und RITTENBERG, D.: Synthesis of heme in vitro by the immature non-nucleated mammalian erythrocyte. J.biol.Chem. 183 (1950), 749-755.
- MASON GUEST, M., BOND, T.P., COOPER, R.G. und DERRICK, J.R.: Red blood cells: Change in shape in capillaries. Science 142 (1963), 1319-1321.

- MURPHY, J.R.: Erythrocyte Metabolism II Glucose Metabolism and Pathways. *J.Lab.clin.Med.* 55 (1960), 286-302.
- NAKAO, M., NAKAO, T., YAMAZOE, S. und YOSHIKAWA, H.: Adenosintriphosphate- and shape of erythrocyte. *J.Biochem.* 49 (1961), 487-492.
- NAKAO, M., NAKAO, T. und YAMAZOE, S.: Adenosine-triphosphate- and maintainance of shape of human red cells. *Nature (London)* 187 (1960), 945-946.
- RAPOPORT, S.: Dimensional osmotic and chemical changes of erythrocytes in stored blood. *J.clin.Invest.* 26 (1947), 591-635.
- PASSOW, H.: Zusammenwirken von Membranstruktur und Zellstoffwechsel bei der Regulierung der Ionenpermeabilität roter Blutkörperchen. *Biochemie des aktiven Transports* (1961), 94-99, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- RACKER, E.: Glutathione reductase (liver and yeast). Colowick, S.P. und Kaplan, N.O. (eds.): *Methods in Enzymology*, Vol. 2, Academic Press, New York (1959)
- RACKER, E.: Spectrophotometric measurement of hexokinase and phosphohexokinase activity. *J.biol.Chem.* 167 (1947), 843-850.
- RUHENSTROTH-BAUER, G.: Die Struktur des Säugetiererythrozyten. *Handbuch d.ges.Hämatologie Bd.1* (1959), 210-228, Urban und Schwarzenberg, München-Berlin.
- SCHEUCH, D. und RAPOPORT, S.: Intrazelluläre Regulation der Aktivität einiger SH-Enzyme durch Glutathion. *Folia Haemat.* 78 (1962), 349-355.
- SCHUBOTHE, H. und GROSS, F.: Wärmeveränderungen roter Blutkörperchen. *Schweiz.med.Wschr.* 83 (1953), 1048-1058.
- SCHULTZE, M.: Ein heizbarer Objektisch und seine Verwendung bei Untersuchungen des Blutes. *Archiv mikr.Anat. (Berlin)* 1 (1865), 1-20.
- SKOU, J.C.: Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane. *Physiol.Rev.* 45 (1965), 596-610.
- TEITEL, P.: Disk-sphere Transformation and Plasticity Alteration of Red Blood Cells. *Nature (London)* 206 (1965), 409-410.

- VOGELL, W., BISHAI, F.R., BÜCHER, T., KLINGENBERG, M., PETTE, D.
und ZEBE, E.: Über strukturelle und enzymatische Muster in Muskeln
von *Locusta migratoria*. *Biochem.Z.* 332 (1959), 81-117.
- WAGNER, jr. H.N., Mc AFEE, J.G., WEINER, J.M., ILIO, M., MARTINEZ, J.
und CAINE, jr. W.P.: The use of Hg-203 labeled bromo-mercuri-hy-
droxypropane (BMHP) in radioisotope scanning of the spleen.
J.Nucl.Med. 4 (1963), 190-200.
- WAGNER, jr. H.N., RAZZAK, M.A., GAERTNER, R.A., CAINE, jr. W.P.,
FEAGIN, O.T.: Removal of Erythrocytes from the Circulation.
Arch.intern.Med. 110 (1962), 90-97.
- WAGNER, jr. H.N., WEINER, J.G., Mc AFEE, J.G. und MARTINEZ, J.:
1-Mercuri-2-Hydroxypropane (MHP). *Arch.Int.Med.* 113 (1964),
696-706.
- WALLER, H.D., LÖHR, G.W. und TABATABAI, M.: Hämolyse und Fehlen
von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in roten Blutzellen.
Klin.Wschr. 36 (1957), 1022-1027.
- WEED, R.J. und REED, C.F.: Membrane alterations leading to red cell
destruction. *Am.J.Med.* 41 (1966), 681-698.
- WEED, R.J. und REED, C.F.: The relation of erythrocyte fragmentation
to cellular destruction. *Blood* 26 (1965), 894-904.
- WINKELMAN, J.W., WAGNER, jr. H.N., Mc AFEE, J.G. und MOZLEY, J.M.:
Visualization of the spleen in man by radio isotope scanning.
Radiology 75 (1960), 465-475.
- YOSHIKAWA, H., NAKAO, M.: Nucleotide metabolism and its relation
to function of preserved human erythrocyte.
Folia Haemat. 78 (1962), 516-524.

Herrn Privatdozent Dr. med. J. Fischer möchte ich für die Überlassung des Themas und für die während dieser Arbeit gegebenen Anregungen aufrichtig danken; desgleichen Herrn Dr. med. Ohler für die Einführung in die Methodik.

Besonders möchte ich Herrn Professor Dr. med. R. Duesberg für die Übernahme des Korreferates danken.



LEBENS LAUF

Am 29. August 1941 wurde ich in Hof/Saale als Sohn des damaligen Reichsbahnrates Dipl.-Ing. Werner Nitschke und seiner Ehefrau Kaja geboren. Im Alter von sechs Jahren wurde ich auf der Sophienschule in Hof/Saale eingeschult. Als Folge der dienstlichen Versetzung meines Vaters übersiedelte die Familie im April 1950 nach Amberg/Oberpfalz. Dort machte ich nach Beendigung der vierten Volksschulklasse die Aufnahmeprüfung zur Oberrealschule und besuchte sie bis August 1954. Nach nochmaliger Versetzung meines Vaters nach Mainz zog die Familie nach Wiesbaden um. Hier besuchte ich die Gutenbergschule, ein Gymnasium für Jungen. Beim Übergang zur Oberstufe folgte ich meinem Interesse für Mathematik und Physik und wählte den naturwissenschaftlichen Zweig. Ich legte am 22. Februar 1961 die Reifeprüfung ab.

Nach freiwilliger Meldung zum Militärdienst bei der Gebirgstruppe, der ich aber wegen eines Unfalls - ich zog mir einen doppelten, komplizierten Unterarmbruch zu - nicht nachkommen konnte, entschied ich mich zum Medizinstudium. Damit folgte ich einem schon früh gehegten Wunsch. Ich begann mein Studium mit dem Sommersemester 1961 an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Meine Berufswahl erwies sich als richtig, denn mir gefiel das vorbereitende Studium in den naturwissenschaftlichen Fächern der Physik, Chemie, Botanik und Zoologie. Ich schloß es mit dem Vorphysikum im Frühjahr 1962 ab. Das Physikum in den Fächern Anatomie, Physiologie und physiologische Chemie bestand ich nach dem Wintersemester 1963/1964.

Wohl überraschte mich die Fülle der klinischen Fächer und die Vielzahl der angekündigten Vorlesungen, doch fand ich mich sehr bald und mit sehr viel Freude in diesem neuen, umfangreichen und vielseitigen Aufgabengebiet zu recht. Bei guter Einteilung des Studienpensums war es sogar möglich, noch neben den Pflichtfächern einige Spezialvorlesungen zu hören. Hier fand ich besonderes Interesse an hämatologischen Problemen. Nach Rücksprache mit Herrn Privatdozent Dr. med. J. Fischer und nach Einführung in die Methodik der photometrischen Enzymbestimmungen durch Herrn Dr. med. Ohler übernahm ich bereits im zweiten klinischen Semester eine wissenschaftliche Arbeit im Rahmen der Milzzintigraphie über Stoffwechselveränderungen in Erythrozyten bei Wärmeeinwirkung. Die ganztägigen Messungen und die Bearbeitung

dieses Themas, die ich in den Semesterferien und während der freien Zeit im Semester durchführte, ermöglichten mir, mit Unterstützung von Herrn Privatdozent Dr. med. Fischer und Dr. med. Ohler einen Einblick in die Methodik des wissenschaftlichen Arbeitens zu gewinnen und literarischen Quellen eines Themas nachzugehen.

Das klinische Studium schloß ich am 28. Juli 1967 mit der Ärztlichen Prüfung an der Universität in Mainz mit dem Urteil "sehr gut" ab.

